N°300

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le titre de

DOCTEUR INGÉNIEUR

par

Philippe FOURNIER

Sujet de la thèse: INDUCTION DE MUTANTS ET ÉTUDE DE PHÉNOMÈNES DE RECOMBINAISON CHEZ LA LEVURE ***CANDIDA TROPICALIS***

Soutenue le *22 Septembre 1976* devant la Commission d'Examen composée de:

MM. J.C. MOUNOLOU Président

J. POURQUIE Rapporteur

H. BANNEROT Examinateur

H. HESLOT " "

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le titre de

DOCTEUR INGÉNIEUR

par

Philippe FOURNIER

Sujet de la thèse: INDUCTION DE MUTANTS ET ÉTUDE DE PHÉNOMÈNES DE RECOMBINAISON CHEZ LA LEVURE ***CANDIDA TROPICALIS***

Soutenue le *22 Septembre 1976* devant la Commission d'Examen composée de:

MM. J.C. MOUNOLOU Président

J. POURQUIE Rapporteur

H. BANNEROT Examinateur

H. HESLOT " "

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Génétique de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, sous la Direction de Monsieur H. HESLOT.

Monsieur le Professeur H. HESLOT m'a accueilli pendant deux années dans son laboratoire. Il m'a offert toutes les facilités pour réaliser ce travail au cours duquel il m'a dirigé, assurant ainsi ma formation. Je lui en exprime ma très vive reconnaissance.

Monsieur le Professeur J.C. MOUNOLOU m'a maintes fois reçu avec une extrême bienveillance et ses conseils m'ont été fort précieux. Qu'il trouve ici l'expression de mes profonds remerciements.

Monsieur J. POUROUIE a suivi avec attention le déroulement de mes travaux et m'a fait d'utiles remarques sur la rédaction. Monsieur H. BANNEROT a obligeamment accepté de juger ce travail. Qu'ils soient tous deux vivement remerciés, ainsi que pour l'intérêt qu'ils ont porté aux entretiens fructueux qu'ils m'ont accordés.

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide du Groupe pétrolier ELF-ERAP.

Tant sur le plan de la conception des expériences que sur le plan de l'interprétation des résultats, je dois en grande partie ce que j'ai pu acquérir à C.M. GAILLARDIN, avec lequel j'ai apprécié au plus haut point et la collaboration et les contacts inoubliables. J'ai également été très judicieusement conseillé par J.M. BECKERICH qui ne s'est jamais lassé de m'expliquer des concepts génétiques qui m'ont été fort utiles pour élaborer des modèles avec son aide. J'ai trouvé en M. ROCHET

../..

sur les domaines les plus variés possibles une source inépuisable d'instruction, et ce à tout moment. M.T. LE DALL m'a plus d'une fois apporté son concours pour la réalisation de longues expériences, avec beaucoup d'amabilité. Je leur exprime à tous ma profonde reconnaissance.

Que tous ceux du laboratoire, avec qui j'ai passé plus de deux ans, et qui ne sont pas nommés ici, ne s'estiment pas oubliés. Beaucoup, qui désirent rester dans l'ombre, m'ont été d'une aide précieuse, d'autres m'ont richement apporté sur le plan des contacts humains. En tous, j'ai toujours à tout instant trouvé ce qui caractérise le laboratoire, ce pour quoi je dis à tous mes remerciements très amicaux, la disponibilité.

P L A N

Pages

INTRODUCTION ..... 1.

I. MATERIEL ET METHODES ..... 4.

1. Nomenclature et conservation des souches.... 4.
2. Milieux et techniques de culture ..... 4.
3. Mutagénèses et sélection de mutants ..... 5.
4. Méthodes et milieux de conjugaison 7
5. Obtention, fusion et régénération de protoplastes 9
6. Technique de coloration nucléaire 10

II. ETUDE PHYSIOLOGIQUE ET GENETIQUE DE *C. TROPICALIS* . 12

1. Généralités sur la biologie de *C. tropicalis* 12
2. Recherche de mutants mitochondriaux 14
3. Mutants résistants 16
4. Obtention de mutants auxotrophes 19
5. Haploidisation à la p-FPA 23
6. Recherche de chlamydospores 25

III. FUSION D'AUXOTROPHES ET ETUDE DES SEGREGATIONS ... 27

1. Croisements préliminaires 27
2. Etude de l'instabilité des produits de fusion 34
3. Utilisation des doubles mutants 38

CONCLUSION 44

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548114_0031

INTRODUCTION

L'utilisation industrielle des microorganismes s'est beaucoup développée dans plusieurs pays, d'abord d'une façon relativement empirique, comme ce fut le cas de la production d'antibiotique par les *Penicillium* , puis plus récemment, d'une manière plus méthodique. Dans le cas de la recherche d'une biomasse, il faut faire un choix entre les levures et les bactéries.
En dépit de leurs paramètres cinétiques de croissance souvent défavorables, les levures sont à court terme certainement les mieux placées : elles présentent une teneur en acides nucléiques plus faible (4-8%), elles acceptent de croître à un pH acide qui diminue les risques de contamination, leur récolte est plus aisée et elles sont considérées avec moins de réserve par les consommateurs. En revanche, beaucoup d'entre elles présentent l'inconvénient d'avoir une teneur en protéines plus faible que les bactéries.

La levure *Candida tropicalis* BERCKHOUT est parmi les plus riches en protéines (60%). Elle est également capable de croître sur n-paraffines et représente à plus d'un titre, une des meilleures levures industrielles pour la production de biomasse (vitesse de croissance, thermophilie).

Quand on veut réaliser une amélioration rationnelle des souches, on peut procéder de deux façons :

- induire des mutations, ce qui s'avère possible lorsque l'on a affaire à des caractères à déterminisme monogénique.
  On peut d'ailleurs procéder par étapes comme dans le cas de l'étude des voies de biosynthèse pour la surproduction et/ou l'excrétion de métabolites.

../..

- utiliser la recombinaison génétique qui permet d'associer dans une souche les caractères favorables des parents. Cette recombinaison peut être assurée soit par l'utilisation d'un éventuel cycle sexuel de l'organisme, soit par tout autre processus réunissant deux génomes dans une même cellule, s'il est suivi d'un phénomène somatique de ségrégation quel qu'il soit (crossing-over, conversions, pertes de chromosomes); c'est la voie parasexuelle.

Les deux tactiques peuvent être utilement combinées.

Sur *Candida tropicalis*, deux types d'approches ont été menées:

1. Sur la base d'études cytologiques et morphologiques, Sukroongreung et de Miranda (1973) ont établi, peut-être hâtivement, les éléments d'un cycle sexuel. Ils distinguent une phase diploïde qui passe à l'état haploïde par bourgeonnement méiotique. Ce dernier état est dit sexuellement inactif : on y observe des chlamydospores, sortes de spores dormantes, qui, mises sur un milieu approprié, germent en donnant une phase haploïde dite sexuellement active; à partir de cette phase aurait lieu la diploïdisation. Mais la conjugaison n'a jamais été effectivement observée, car les auteurs se basent sur les colorations nucléaires, et celles-ci ne permettent pas de distinguer la mitose de la conjugaison. De plus aucun dosage d'ADN n'a été réalisé. L'espèce voisine, *Candida albicans* a été étudiée par Van der Walt (1967,1970) et Van der Walt et Pitout (1969) en utilisant à la fois des critères morphologiques et caryologiques complétés par des déterminations d'ADN. Ces auteurs ont proposé un cycle dont Sukroongreung et de Miranda se sont inspirés pour *C. tropicalis* Chez *C. albicans*, les chlamydospores seraient éventuellement le siège d'une méiose.

../..

2. A l'opposé de ces auteurs, Gaillardin et Heslot (1971) se sont basés sur des arguments radiobiologiques et génétiques pour aborder le problème. Ils ont montré qu'une des souches étudiées était vraisemblablement diploïde. Sur des haploïdes présumés obtenus par l'action de la DL-para-fluorophénylalanine, ils ont induit des auxotrophes qui ont pu fusionner. A partir des produits de fusion, ils ont obtenu uniquement les types d'auxotrophes parentaux et jamais les phénotypes recombinés. Sur la base d'une même méthodologie, A. Ermine (1975) a obtenu une souche dicaryotique instable en croisant les souches parentales. Cependant il a rencontré des difficultés pour l'obtention de mutants stables.

Compte-tenu de ces travaux antérieurs, le problème qui se posait à nous pouvait se définir soit comme la recherche d'un cycle sexuel chez la levure *Candida tropicalis*, soit comme la recherche de phénomènes de recombinaison. En effet, le but de notre travail était double : d'une part étudier génétiquement une nouvelle espèce de levure, d'autre part proposer à ses utilisateurs industriels un outil maniable pour l'amélioration des souches. Pour répondre à cet objectif, il est apparu qu'il convenait, dans un premier temps, d'induire des mutants divers, et ensuite de les utiliser en vue de l'obtention de la recombinaison génétique.

I. MATERIEL ET METHODES

1. Nomenclature et conservation des souches

On dispose de 4 souches de *Candida tropicalis* BERCKHOUT, isolées du sol. Les souches A, B, D ont été fournies par le Groupe pétrolier ELF-ERAP; la souche C a été donnée au laboratoire par le Dr.Meyrath. Nous les avons reçues sur gel de silice ou sur tube de milieu complet. Par la suite, après repiquage et purification dans le cas de mutants, toutes les souches ont été conservées en collection à -60°C sur milieu complet liquide contenant 20% de glycérol. Pour l'utilisation courante, les souches sont repiquées sur milieu complet, éventuellement supplémenté en métabolites requis (50 mg/l) dans le cas de certains mutants. Les auxotrophes sont désignés par la lettre de référence de la souche d'origine suivie du besoin (exemple : D met^-, mutant exigeant en méthionine de la souche D). Lorsque le besoin peut être couvert indifféremment par deux métabolites distincts, on l'indique par une barre transversale séparant les noms des auxotrophies, (exemple : C cyt^-/ura^-, mutant exigeant en cytosine ou uracile de la souche C). Les croisements sont indiqués par les lettres de référence des souches, séparés par une croix, (exemple : D met^-lys^- X C cyt^-ade^-) et les produits de fusion de même, avec une virgule (exemple :(D met^-, C cyt^-)). Les ségrégants des prototrophes sont parfois indiqués par les lettre de référence des souches parentales suivies de l'auxotrophie, (exemple : CD ade^-his^-).

2. Milieux et techniques de culture

a) Milieux solides ou liquides

Le milieu minimum pour la croissance de la souche sauvage de *C. tropicalis* est défini comme suit (MM) : glucose 1%, sels minéraux A2 (Leupold 1955) 10%, thiamine 100 ppm, biotine 10 ppm, agar Difco (éventuellement) 2%, eau distillée : q.s.p. 1 l.

../..

Le milieu complet YEA contient : extrait de levure (Difco) 5°/₀₀ glucose 3%, agar éventuellement 1,5%, eau distillée 1 l.
Les milieux solides et liquides ont la même composition et peuvent être tamponnés par le tampon acide citrique 0,1 M, phosphate disodique 0,2 M.
On a également utilisé d'autres MM plus pauvres en ammonium que le milieu standard (qui en contient 5 g/l), ce sont le MMN_{500} (500 mg/l de $(NH_4)_2SO_4$), le milieu MMN_{100} (100 mg/l) et le MMN_0 dépourvu de source d'azote. On s'est de même servi, comme témoin de croissance sur boîte, de milieux sans source de carbone MMC_0.

Les milieux sont stérilisés 20 minutes à 120°C; on stabilise par filtration les composés fragiles tels que le tryptophane, la canavanine, la L-S-aminoéthylcystéine...

b) Techniques de culture

Les cultures liquides sont réalisées sur une table d'agitation à 28-30°C, par ensemencement de fioles de Klett ou à diverticule latéral à partir d'un inoculum solide ou liquide. La croissance est suivie au néphélomètre (Klett-Summerson), ou par comptage à l'hématimètre, mais cette dernière technique nécessite une sonication préalable des échantillons pour dissocier les agrégats de cellules.

3. Mutagénèses et sélection de mutants

Dans l'espoir d'obtenir des mutants stables, on s'est adressé au rayonnement γ qui est réputé induire plus de macrolésions (type délétion) que d'autres agents mutagènes. On a donc utilisé le ^{60}Co à la dose de 75 Krad qui assure environ 10% de survie. Les radiations ionisantes induisant des radicaux libres qui peuvent entraîner la formation de produits toxiques pour la croissance, on lave les cellules irradiées par filtration (sur filtre Millipore GSWP 0,22 µ).

Dans le cas où l'on ne procède pas à un enrichissement en auxotrophes, on étale directement des dilutions de la suspension irradiée, que l'on conserve à -60°C dans 20% de glycérol. Après avoir déterminé la dilution adéquate en fonction du taux de survie, on étale sur YEA, puis on réplique sur MM et YEA pour chercher les auxotrophes.

Après avoir mis au point une méthode d'enrichissement à la nystatine (cf. II, 4) on a suivi après irradiation le protocole suivant : les cellules sont resuspendues dans du YEA liquide. Après une période de latence de 4-5 H, elles commencent à se diviser. Lorsque la densité optique s'est multipliée par un facteur 2 à 4, on lave les cellules et on ensemence à 8.10^6 cellules/ml un milieu liquide MMN_0 pour carencer les auxotrophes, de telle manière que lorsque plus de 12 heures après, on rajoute du sulfate d'ammonium, seuls poussent les prototrophes. Après 4 à 6 heures de latence, la croissance démarre et après 1 à 2 générations, on fait agir la nystatine, à la concentration finale de 40 µg/ml pendant 8 minutes. Cette substance tuant sélectivement les cellules en division, on réalise un enrichissement en auxotrophes. On étale alors sur YEA à la dilution convenable. On purifie les mutants 3 à 4 fois par strie sur YEA puis réplique. La détermination des besoins des auxotrophes ainsi purifiés se fait par test en gouttes sur des milieux minimums supplémentés par de l'hydrolysat de caséine (casamino acids Difco, 2 g/l), additionné de tryptophane (50 mg/l), ou par des bases azotées (50 mg/l pour chaque), ou par des vitamines (pantothénate, acide nicotinique méso-inositol, 50 mg/l chaque) seuls ou en combinaison. Pour déterminer précisément le ou les besoins en acide aminé, on utilise la grille de milieux suivante où les acides aminés indiqués sont ceux présents dans le milieu.

	1	2	3	4
5	GLY	ASN	GLN	MET
6	LEU	ASP	TRY	GLU
7	SER	ARG	LYS	ILE
8	PHE	PRO	CYS	TYR
9	ALA	HIS	VAL	THR

Dans le cas où l'on recherche des mutants résistants à des substances toxiques, on étale environ 10^6 cellules irradiées par boîte de milieu contenant la substance et on attend l'apparition des colonies résistantes un temps variable suivant les cas (cf. II, 3). Les mutants sont purifiés par passages successifs sur boîte de milieu sélectif.

Dans la suite du texte, on utilise les abréviations : leu, ade, nicot, his, cyt, cyst, met, ura, lys, pro, pour désigner les phénotypes des mutants exigeant respectivement en leucine, adénine, acide nicotinique, histidine, cytosine, cystéine, méthionine, uracile, lysine et proline.

4. Méthodes et milieux de conjugaison et de sporulation

a) Technique

Pour réaliser la conjugaison entre deux auxotrophes complémentaires, on a utilisé une première méthode simple de collage par centrifugation. On réalise pour chaque parent une suspension de 10 ml à partir de deux tubes de préculture solide (environ 10^8 cellules/ml). Après lavage, les cellules sont remises en suspension dans 5 ml d'eau physiologique. On réalise un mélange de 1 ml de chaque suspension parentale; on le centrifuge et on le laisse la nuit à 25°C en présence du surnageant. Comme témoin de réversion, 2 ml de chaque parent subissent le même traitement. Puis les culots sont remis en suspension et on étale environ 10^7 cellules par boîte de milieu minimum sur 10 boîtes pour le mélange et 10 boîtes pour chaque parent.

Dans certains cas, on a aussi utilisé le mélange des souches sur la substance haploïdisante DL-para-fluorophénylalanine (p-FPA). On cultive les deux parents auxotrophes sur YEA + pFPA (7 g/l), pendant 3 jours sur table d'agitation à 30°C. On réalise alors un mélange de cellules des deux souches en même nombre dans le même milieu et on attend 4-5 jours.

On laisse agiter également chaque parent pendant le même temps. On peut alors soit étaler directement les suspensions sur MM, soit ensemencer des milieux de conjugaison.

b) Milieux de conjugaison

Ces milieux ont été décrits respectivement par Herman (1971) (milieu RG), Mac Clary et al (1959) (milieu MC), et enfin par Wickerham (1951) (milieu YM). Sur le milieu RG, Herman (1971) et Gaillardin (1976) ont observé des figures zygotiques chez *Saccharomycopsis lipolytica*; les milieux MC et YM stimulent la conjugaison chez cette même levure (Gaillardin et al. 1973). Les cultures dans ces milieux sont agitées doucement (200 TPM, Aquatherm New Brunswick Scientific). Des prélèvements sont étalés directement (milieu RG) ou après dilution au 1/10è (YM, MC) sur MM, et ceci tous les deux jours pendant 6 jours.

c) Milieux de sporulation

Pour induire une éventuelle sporulation et la formation de chlamydospores, nous avons ensemencé diverses souches dans le/les milieux suivants :

. milieu de Fowell (1952) à l'acétate (0,4%) de pH 7

. milieu de Dodge au maïs (40 g/l de farine de maïs, 1 l d'eau); incuber une nuit à 60°C, filtrer, ajouter éventuellement 20 g d'agar, et stériliser 30 minutes à 110°C). Nous avons tamponné ce milieu à pH 6,6.

. milieu V8 de Wickerham (1951) adopté par Gaillardin et al (1973), de pH 6,5.

. milieu à la N-acétyl-D-glucosamine (1 g/l) de Strippoli et Simonetti (1975), additionné de 2 ppm de biotine, 20 ppm de thiamine, tamponné à pH 6,5 par le MES.

. milieu au riz de Taschdjian (1951) avec soit 2 ppm de biotine et 20 ppm de thiamine, soit avec 10 ppm de biotine et 100 ppm de thiamine.

. milieu au malt (30 g/l), tamponné à pH 6,6.

Tous ces milieux ont été utilisés sous forme liquide; de plus les milieux au malt, V8 et riz ont aussi été employés solides.

5. Obtention, fusion et régénération de protoplastes

La méthode d'obtention de protoplastes est inspirée de celle de P. Housset et al (1975) sur *Schizosaccharomyces pombe* et adaptée par A. Provost (comm. pers.) à *Candida tropicalis*. On réalise une culture sur le milieu YPGT de Svilha et al (1961), composé de 0,5 g de yeast extract, 0,5 g de peptone, 3 g de glucose, 74,5 mg de L-méthionine, 67,5 mg de DL-homocystéine thiolactone, 100 mg de DL-méthionine méthyl sulfonium chloride, 100 ml d'eau distillée.

Chaque souche parentale est mise à agiter 4 à 5 H. à 30°C pour assurer le démarrage de la culture. Cette culture est laissée la nuit à la température ambiante sans agitation, de manière à récolter des cellules en phase exponentielle. Il faut obtenir environ 5.10^8 cellules par souche. Après deux lavages dans l'eau distillée, on met en suspension le culot dans le tampon PTP (99 mM Tris, 860 µM EDTA, 50 mM dithiothreitol. Le tampon PTP est stérilisé par filtration juste avant l'emploi. La suspension est soniquée, puis incubée à 30°C sans agitation, de telle sorte que le temps global de traitement au PTP n'excède pas 10 minutes. Les cellules sont lavées avec du KCl 1,2 M et remises en suspension dans 4 ml de la solution enzymatique suivante : 1 ml de suc digestif d'Helix pomatia (Industrie Biologique Française, Gennevilliers), 2 ml de KCl 1,2 M et 1 ml de dithiothreitol 20 mM (environ 3 g/l). Après 1 heure d'incubation sans agitation à 30°C, la conversion en protoplastes est complète. Les protoplastes sont alors lavés par une solution de KCl 1,2 M + $CaCl_2$ 0,2% (photo n°1)

Pour réaliser ensuite la fusion, on doit mélanger en quantité égale des protoplastes des deux parents, conserver des suspensions parentales et traiter les trois suspensions de la même façon. Dans une boîte de pétri stérile vide, on met 0,1 ml de suspension de protoplastes, 0,1 ml de polyéthylène-glycol (PM 6000) à 20% + $CaCl_2$ 0,2%. On assure le mélange délicatement avec l'extrémité d'une tige de verre stérile. On laisse agir 6 minutes, après quoi

on opère la régénération des parois en ajoutant, délicatement pour ne pas détruire les accolements de protoplastes réalisés par le PEG (photo n° 2), du MM liquide + 8% de mannitol. On ajoute 1,5 ml de ce milieu, puis 5 minutes après, 1 ml, enfin 5 minutes après encore 1,5 ml. On laisse la régénération s'opérer pendant quatre heures au moins. Les cellules (photo n° 3) sont centrifugées, lavées et étalées sur MM après avoir fait un comptage, de telle manière qu'il y ait toujours le même nombre de cellules du mélange que de chaque parent.

6. Technique de coloration nucléaire

Cette méthode est basée sur la coloration chromatique par le Giemsa, mise au point par Robinow chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* (voir Ganesan et Swaminathan 1958) et adaptée par lui-même à *Candida tropicalis* (comm. pers.). Après avoir précultivé la souche à colorer sur tube de milieu complet, on ensemence les cellules en stries sur boîtes de YEA. On incube à 30°C et 5 à 6 H. plus tard on prélève un fragment de gélose que l'on frotte sur une lamelle recouverte d'albumine.

Cette lamelle est immédiatement trempée dans le fixateur de Helly dont la composition est la suivante : $HgCl_2$ 5 g, $K_2Cr_2O_7$,3 g, formol neutre à 40% 6 ml, eau distillée 94 ml (on ajoute le formol au moment de l'emploi). La fixation s'opère à température ambiante pendant 15 minutes. On lave ensuite dans de l'alcool à 70% jusqu'à disparition de la coloration jaune. On procède ensuite à une double hydrolyse : avec NaCl (1%), puis HCl(N) pendant respectivement 1 heure et 15 minutes à 58-60°C au bain marie. Ce traitement a pour but d'hydrolyser une fraction de l'ARN, et d'assurer une meilleure fixation du colorant sur la chromatine. On rince dans le tampon suivant : 10 ml de KH_2PO_4 (33,5 g/l), 20 ml de Na_2HPO_4,12 H_2O (75 g/l), eau distillée qsp 1 l. La coloration s'opère à température ambiante pendant un minimum de 45 minutes dans le Giemsa Gurr (18 gouttes pour 10 ml de tampon). On peut alors monter dans du tampon et luter la lamelle avec le glycéel Gurr.

On observe à sec avec un objectif X 40 et un oculaire X 10, ou bien à l'immersion (grossissement X 900).

Dans quelques cas particuliers (souches instables sur YEA), les colorations ont été réalisées après culture sur MM. La vitesse de croissance sur MM étant moindre que sur YEA, on a ensemencé dans ce cas la veille au soir sur boîte de MM et on a coloré le lendemain matin. L'important est de colorer des cellules en phase exponentielle, surtout si l'on veut faire des comparaisons de taille de noyaux (voir photos 8 et 9).

II. ETUDE PHYSIOLOGIQUE ET GENETIQUE DE *C. tropicalis*

Pour l'étude en croisement des souches de *Candida tropicalis*, il convenait de disposer d'un outil génétique, constitué par une série de mutants dans diverses souches; ceci dans le but d'avoir un crible simple de sélection des produits de fusion d'une part, et d'en analyser la descendance d'autre part. Enfin la connaissance de la biologie (physiologie, croissance, morphologie...) est nécessaire pour la compréhension des résultats ultérieurs.

1. Généralités sur la biologie de *C. tropicalis*

Autrefois appelée *Monilia candida* (Benham 1931), cette levure fut nommée *C. vulgaris* et choisie comme type des *Candida*. En 1942, Didden et Lodder ont assimilé *C. vulgaris* à *C. tropicalis*, et *C. albicans* est devenue l'espèce type du genre *Candida*.

Comme critères taxonomiques, nous avons vérifié la non utilisation de certains sucres, tels que le D-ribose, le lactose, le L-arabinose et l'inuline. On pourrait imaginer d'induire des mutants utilisateurs comme Karassevitch (1976) l'a fait sur *Torulopsis candida*, mais ce type de marqueur génétique est probablement dominant, ce qui est un inconvénient grave pour notre type d'étude. L'identification complète des souches a été faite au laboratoire des levures de Delft (Centraal Bureau voor Schimmelcultures).

Candida tropicalis est de type levuriforme sur les milieux courants. Sur d'autres milieux, comme le V8 et le milieu au riz, on observe une certaine filamentation (photo n° 12). La division cellulaire a lieu par bourgeonnement. Les bourgeons restent parfois accolés à la cellule mère et c'est le cas, de manière systématique, pour la souche D qui forme ainsi des amas de cellules. Ces dernières sont de taille très variable selon les milieux et l'on observe aussi une hétérogénéité sur un même milieu. Il y a toujours des cellules plus petites à côté de cellules normales (photo n° 6, sur YEA), comme noté par Gaillardin et Heslot (1971). Ces petites cellules résultent peut-être de divisions anormales, car elles ne bourgeonnent pas quand on les isole par micromanipulation (cf. II.5).

Il existe également une hétérogénéité de morphologie coloniale; on a pu séparer dans la souche B deux types, l'un à colonies lisses, l'autre à colonies "frisées". Une observation similaire avait été faite dans la souche A par Barrère (comm. pers.). On a travaillé uniquement sur le type lisse, plus facile à répliquer. On a incidemment noté un rapport de taille de noyaux des cellules entre les colonies "lisses" et les colonies frisées égal à 1,29 (voisin du rapport théorique diploide/haploïde de 1,26) (voir photos n° 8 et 9).

Du point de vue du métabolisme, l'examen des courbes de croissance ne révèle pas d'effet glucose. En revanche, cette levure qui peut respirer ou fermenter, voit sa fermentation inhibée en présence d'oxygène (fort effet Pasteur), décrit par Pons et al (1975) chez *C. tropicalis*).

Ces caractéristiques font de cette levure un matériel tout à fait adéquat pour des cultures en continu.

Nous avons testé la vitesse de croissance des diverses souches sur MM et sur YEA liquide dans des conditions identiques d'agitation (380 TPM) à 30°C et 36°C. Les résultats sont les suivants : (on a indiqué les temps de génération).

	MM		YEA	
	30°C	36°C	30°C	36°C
A	1 H.05	1 H.40	1 H.	1 H.
B	1 H.20	-	1 H.	1 H.10
C	1 H.25	1 H.25	1 H.	1 H.15
D	1 H.25	1 H.45	55 min.	1 H.05

../..

Deux remarques peuvent être faites :

- il y a toujours une légère augmentation du temps de génération à 36°C quoique la levure soit thermorésistante. On a travaillé par la suite à 30°C.

- la vitesse de croissance sur MM est un peu inférieure à celle sur YEA.

Toutefois il faut noter que ce test a été réalisé dans des conditions optimales d'agitation et de pH (précultures en milieu tamponné), qui n'ont pas toujours été réunies dans les expériences ultérieures, d'où une augmentation, dans ces cas, du temps de génération.

L'influence du pH a été testée en milieu minimum tamponné. Aucune différence n'a été observée entre les pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 qui constituent la meilleure zone de pH pour réduire le temps de latence selon Ermine (1975).

L'existence d'une fermentation permettait de penser qu'il n'était pas exclu d'obtenir des mutants "petite colonie" ayant perdu l'activité respiratoire.

2. Recherche de mutants mitochondriaux

Les mutants petite colonie sont des mutants présentant une incapacité à respirer, de déterminisme mitochondrial (mutants ρ^-) ou nucléaire. Ce type de mutants est intéressant pour l'utilisation comme marqueur facilitant la détection de la fusion cellulaire. En effet, on pouvait penser réaliser des croisements du type souche auxotrophe x souche "petite" sur un milieu minimum contenant un substrat carboné respirable. D'autre part, les mutants du type ρ^- sont d'une très grande stabilité.

Parmi les substrats respirables utilisables comme seule source de carbone, nous avons trouvé le succinate, l'éthanol, le lactate. En outre, l'acétate, le fumarate et le citrate permettent encore une assez bonne croissance de la souche sauvage. Cette croissance

est faible sur héxadécane en boîte, nulle sur malate et adipate au pH habituel (pH 5). On a choisi l'éthanol ou le lactate qui donnent une croissance nette. La croissance sur glycérol est faible.

Le chloramphénicol est un antibiotique inhibant la synthèse protéique mitochondriale des levures (Bolotin et al. 1971). Toutefois si les cellules poussent sur lactate ou éthanol à pH 5 ou à pH 7, on ne constate pas d'inhibition. La résistance de *C. tropicalis* au chloramphénicol a été déjà signalée par Soom (comm. pers.). En revanche, il y a une forte inhibition de la croissance en présence de fuchsine ou de bromure d'éthidium. On peut rechercher l'apparition de petites colonies sur un milieu différentiel (1% d'éthanol, 1°/.. de glucose à pH 6,5 réalisé par le tampon phosphate 2,5 . 10^{-2}M) additionné de la concentration adéquate d'inhibiteur. La fuchsine n'a pas d'effet sur la croissance à 10 mg/l; on a utilisé la concentration de 25 mg/l. Les colonies apparaissent après un temps de latence important de l'ordre de 15 jours à un mois. Nous avons obtenu ainsi plusieurs colonies dont 5 ont présenté une croissance retardée sur éthanol, source de carbone, mais jamais une incapacité totale à utiliser ce substrat. D'autre part, même à une faible concentration (2 mg/l), aucune colonie n'est jamais apparue sur bromure d'éthidium.

Une autre méthode pour mettre en évidence les clones "petite colonie" est d'utiliser la coloration au chlorure de 2, 3, 5 triphényl-tétrazolium (TTC). Nous avons testé cette méthode en appliquant le protocole de Nordström (1967). On verse sur la boîte où se sont développées les colonies le milieu suivant : 1,5% d'agar dans du tampon phosphate 67 mM à pH 7,0, 5 g/l de glucose, le tout étant fondu et ramené à 40-45°C, on ajoute le TTC (1 g/l). Sur glucose, les colonies apparaissent toutes rouges. On peut penser que c'est le système respiratoire qui fonctionne normalement, l'effet Pasteur assurant en milieu aéré un métabolisme oxydatif presque exclusif (Pons et al 1975). Certains auteurs ont d'ailleurs montré que cette coloration pouvait être utilisée comme critère taxonomique pour *C. tropicalis* (Pagano et al 1957).

Cependant nous avons trouvé trois mutants donnant une coloration blanche sur glucose (et rouge sur glycérol source de carbone). Il se peut que ces mutants aient perdu l'effet Pasteur. Mais on sait qu'il existe vraisemblablement une voie respiratoire secondaire chez *C. tropicalis*. En effet, Soom (comm. pers.) signale une insensibilité aux antibiotiques mitochondriaux en général; Herman (1967) et Teranishi et al (1974) ont décrit une respiration insensible au cyanure, et Subik et al (1974) et Gallo et al.(1974) à l'antimycine; d'autre part, des "microbodies" ou peroxysomes ont été rapportés par Osumi et al (1975). On peut donc supposer que chez les mutants mentionnés ci-dessus , cette voie annexe a disparu : ces mutants constitueraient donc un matériel intéressant pour la recherche de petites.

Quoi qu'il en soit, nous ne sommes pas parvenus encore à obtenir des "petites" et nous n'avons pas prolongé cette étude qui aurait pu être intéressante, mais trop longue par rapport au but recherché.

3. Mutants résistants

On recherche des mutants qui croissent sur un milieu contenant un inhibiteur. Ce type de mutant peut être utile, s'il est introduit en sus de l'auxotrophie dans une des souches parentales et si d'autre part il est récessif, de telle manière que le produit de fusion soit sensible. L'intérêt de ce type de mutants est qu'au cours des croisements entre auxotrophes sur MM, on ne réalise pas de sélection sur ces marqueurs. Nous avons testé des composés réputés inhibiteurs chez les levures et les champignons inférieurs.

a) Composés s'étant révélés non inhibiteurs

α. Les analogues suivants de bases azotées et d'acides aminés ont été testés à la concentration de 500 mg/l sauf indication contraire : 5-méthyl-tryptophane, 7-azatryptophane (400 mg/l), acide 3-indole-acrylique, L-S-amino-éthyl-cystéine (400 mg/l), canavanine, β-thiénylalanine, 1-2-4-triazole-3-alanine (200 mg/l),

../..

méta-fluorophénylalanine, DL-parafluorophénylalanine (800 mg/l) éthionine et azaguanine. L'absence de toxicité pouvait être dûe à un pool interne élevé d'acides aminés empêchant l'entrée de l'analogue. On a donc réalisé l'expérience suivante : carence en MMN_0, puis étalement sur canavanine N_{100} ou sur canavanine + lactate source de carbone (pour éviter une répression éventuelle des perméases par l'ammonium dans le premier cas, le glucose dans le deuxième). Nous n'avons pas davantage observé de toxicité dans ces conditions. Nous ignorons si ces substances entrent ou non dans la cellule.

β. Des résistants au méthylammonium (mea) déréprimés dans toutes les activités ammonium - répressibles ont été trouvés par Arst et Cove (1969) sur *Aspergillus nidulans* et Roon et al (1975) sur *S. cerevisiae*. Dans leurs conditions (100 mM de mea en présence de 10 mg d'azote cytosique et sans azote ammoniacal), il n'y a pas de toxicité chez *C. tropicalis*.

γ. Sur un milieu contenant un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide, Wilkie et Lee (1965) ont décrit des mutants résistants à 1°/$_{oo}$chez *S. cerevisiae*, tandis que Warr et Roper (1965) ont trouvé des résistants à la concentration de 2,5 g/l chez *Aspergillus nidulans*. Même à cette dose, nos souches sont résistantes,, contrairement aux observations de M. Drouhet (comm. pers.) sur d'autres souches de *Candida tropicalis*.

b) Composés inhibiteurs

- L'acide propionique est toxique à 400 mg/l. On voit apparaître des colonies résistantes au bout de 6 jours. Après passage sur MM et étalement sur milieu à l'acide propionique, ces mutants croissent, mais avec un retard d'environ deux jours. Ceci rend leur utilisation délicate du fait que certains mutants auxotrophes sont "leaky".

- Le vert malachite (VM) (chlorhydrate de bis (N,N' dimethylanilino), phényl, carbinol) est inhibiteur de la croissance d'*Aspergillus nidulans* et la résistance obtenue dans ce cas a été démontrée récessive (Warr et Roper 1965). La dose de 5 mg/l est inhibitrice chez *C. tropicalis*. Des mutants apparaissent après irradiation aux rayons γ et étalement direct des cellules. Après passage sur YEA et réétalement sur milieu VM, ces mutants se comportent comme la souche sauvage, sensible. Des mutants résistants apparaissent cependant au bout de quelques jours. Ce phénomène mériterait d'être étudié. On a vérifié qu'il ne s'agissait pas d'une résistance de déterminisme non nucléaire, qui serait contre-sélectionnée par le passage intermédiaire sur YEA, en supprimant cette étape : le comportement des mutants reste le même.

- La 5-fluorocytosine est toxique pour les souches A, B et D. La souche C est résistante, mais malheureusement non utilisable car les mutants dans cette souche sont soit C cyt$^-$, soit C met$^-$ (met$^-$ a un taux de réversion élevé). On a pu induire des résistants dans les souches A, D, B, aux doses respectives de 100, 200 et 500 mg/l. L'existence d'une résistance naturelle à la 5-fluorocytosine, comme c'est le cas pour la souche C a été décrite par Drouhet (1974)

- La toxicité de la fuchsine a déjà été décrite au paragraphe précédent. Parmi les colonies qui poussent sur le milieu différentiel à 25 ou 30 mg/l de fuchsine, on a isolé des résistants dans les souches A, B,C et A leu$^-$. Cette possibilité d'induction étant démontrée, on pourra chercher à obtenir de tels mutants dans les souches doublement auxotrophes utilisées pour les croisements.

  On peut noter que ces mutants présentent un comportement particulier par rapport à la souche sauvage comme l'indique le tableau suivant :

Souches	sur glucose + fuchsine	sur éthanol + fuchsine
Sauvage	+	-
Résistant	-	+

+ = croissance
- = absence de croissance

La souche sauvage fermente sur glucose, donc pousse en présence de fuchsine, tandis que respirant sur éthanol, sa croissance est bloquée par la fuchsine. Les résistants ne sont pas inhibés dans ce dernier cas, mais ils le sont sur glucose - fuchsine. Il y aurait inhibition de l'effet Pasteur par la fuchsine, comme cela est décrit (Ramaiah 1974) pour de nombreux facteurs interférant avec la respiration (cyanure...)

4. Obtention de mutants auxotrophes

a) Les mutagénèses

Elles sont opérées aux rayons γ. Les courbes de sensibilité des souches A, B, C sont données sur la figure 1.

Il a été impossible d'obtenir une courbe analogue pour la souche D, ceci étant dû à la formation d'agrégats de cellules qui masquent la létalité. La survie varie entre 5 et 12% à 75 Krad. Il semble qu'il y ait deux pentes successives dans ces courbes, ce qui suggère que les souches pourraient être diploïdes (Latarjet, Ephrussi 1949).

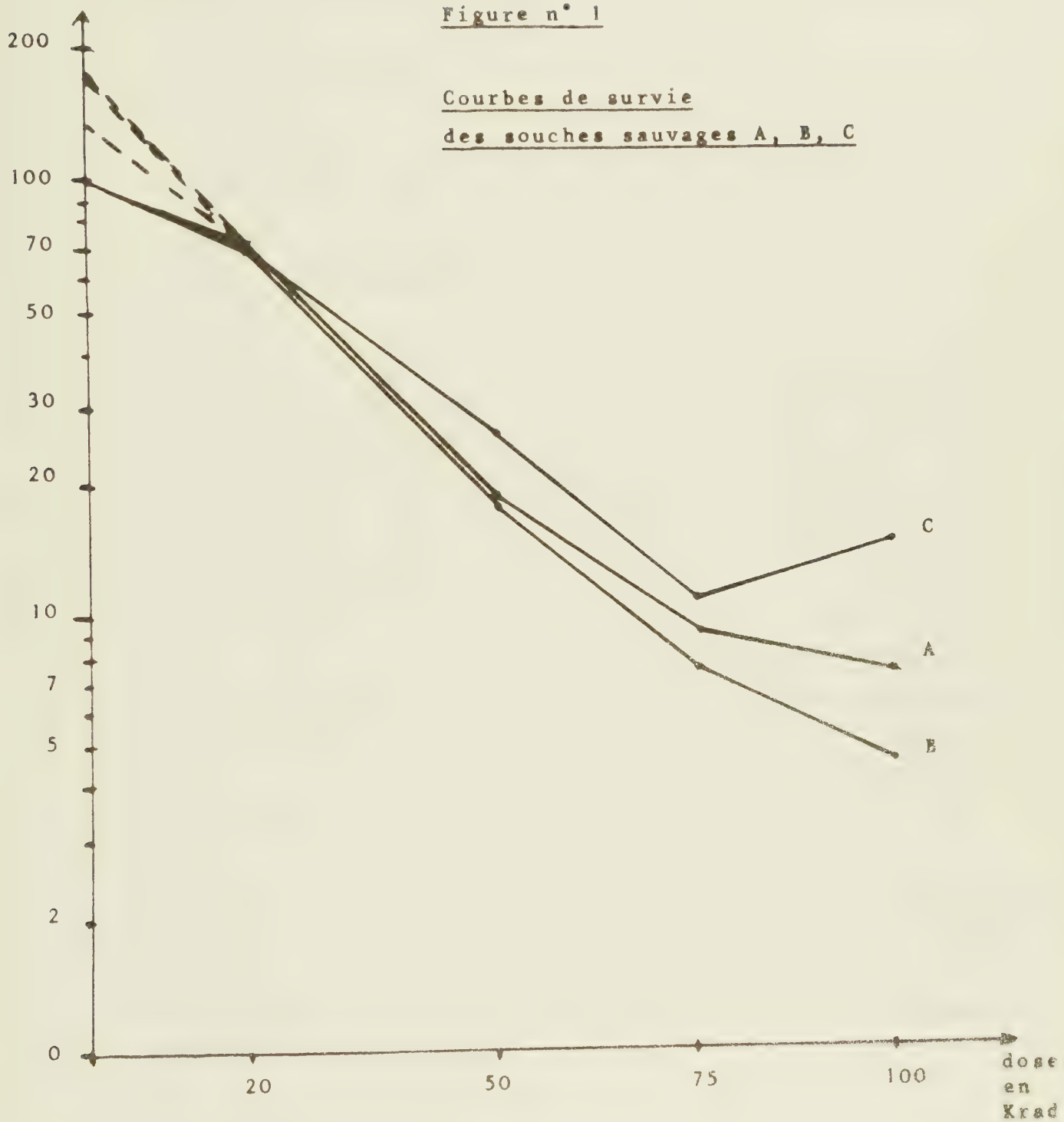
b) Mutants obtenus

On a pu, par la méthode directe sans enrichissement, obtenir 11 mutants sur 80 000 colonies, et ceci dans diverses souches et après avoir réalisé 9 mutagénèses, dont certaines infructueuses.

../..

Figure n° 1

Courbes de survie
des souches sauvages A, B, C



Les souches A, B, C présentent des taux voisins, puisqu'on a obtenu :

- dans la souche A, 5 mutants sur 33060 colonies, soit 1 pour $1,5 \cdot 10^4$
- dans la souche B, 2 mutants sur 9 000 colonies, soit 1 pour $2,2 \cdot 10^4$
- dans la souche C, 3 mutants sur 13 160 colonies, soit 1 pour $2,3 \cdot 10^4$.

La souche D paraît moins sensible à l'irradiation γ : 1 mutant a été obtenu sur 25 130 colonies, soit 1 pour $3,9 \cdot 10^5$.

Parmi les 11 mutants, 4 étaient trop "leaky" pour qu'on détermine leur besoin auxotrophique. Il est donc resté 7 mutants utilisables dont la liste est la suivante : A leu^-, A $nicot^-$, A ade^- (rouge), B his^-ade^-, C cyt^-/ura^-(1), C cyt^-ura^- (2), D $met^-/cyst^-$. A ceux-ci il faut ajouter deux mutants déjà possédés par le laboratoire. C met^- et D cyt^- obtenus respectivement sous l'effet de rayons γ et de la nitrosoguanidine. Certains des mutants sont "leaky", comme A ade^-, et à un moindre degré A $nicot^-$ et D met^-. D'autre part les fréquences de réversion sont loin d'être négligeables pour les mutants A $leu^-(1,3.10^{-6})$, A $nicot^-$ (5.10^{-7}) et C met^- $(1,2.10^{-5})$. Le taux de réversion des autres mutants est inférieur à 10^{-7}, parfois 10^{-8}. Il semble donc que la radiation γ n'a pas induit que des délétions.

Ces inconvénients d'une part, l'interprétation des ségrégations des produits de fusion de l'autre, nous ont conduit à induire des doubles mutants à partir des simples mutants, par une méthode plus efficace que la séquence mutagénèse - étalement direct.

../..

c) Enrichissement à la nystatine

La nystatine est un antibiotique antifungique du groupe polyène utilisé par Moat et al.(1959) et Snow (1966) sur *Saccharomyces cerevisiae* pour enrichir en mutants une population mixte d'auxotrophes et de prototrophes. Cette possibilité repose sur l'action létale sélective de la nystatine sur les cellules en division. A. Ermine (1975) a appliqué cette technique avec succès à *Candida tropicalis*, mais il a montré (A. Ermine et al (1976) que l'on sélectionnait sans doute des mutants résistants à la nystatine. Or on sait par Fryberg et al (1976) et Woods et al (1974) que de tels mutants résistants ont des membranes altérées quant à leur contenu en stérols. C'est un sérieux inconvénient car ces mutants risquent d'avoir une perméation modifiée.

Nous avons donc été conduits à modifier le traitement utilisé par A. Ermine : on traite la suspension pendant un temps court (8 minutes) par une concentration en nystatine de 40 µg/ml. Ces conditions entraînent la mort des cellules en division sans trop altérer les cellules au repos. On peut ainsi espérer un enrichissement par un facteur 10^3 (voir figure 2). Une expérience de reconstitution a été faite : partant d'un mélange auxotrophe/prototrophe dans le rapport 0,35°/₀₀, on récupère, après traitement, 44% d'auxotrophes soit un facteur d'enrichissement de 1260. Nous avons ainsi obtenu un mutant ade$^-$ dans la souche C cyt$^-$(1), noté C cyt$^-$ade$^-$ et 22 mutants dans la souche D met$^-$, à savoir 3 mutants cyst$^-$, un lys$^-$, 7 ade$^-$ (dont 4 rouges), 7 his$^-$, 3 pro$^-$.

Pour l'enrichissement, on a songé au déoxy-2-glucose utilisé chez *S. pombe* mais ce composé n'est pas toxique sur *C. tropicalis* (à 500 mg/1).

On peut faire quelques remarques à propos des besoins nutritionnels des mutants :

../..

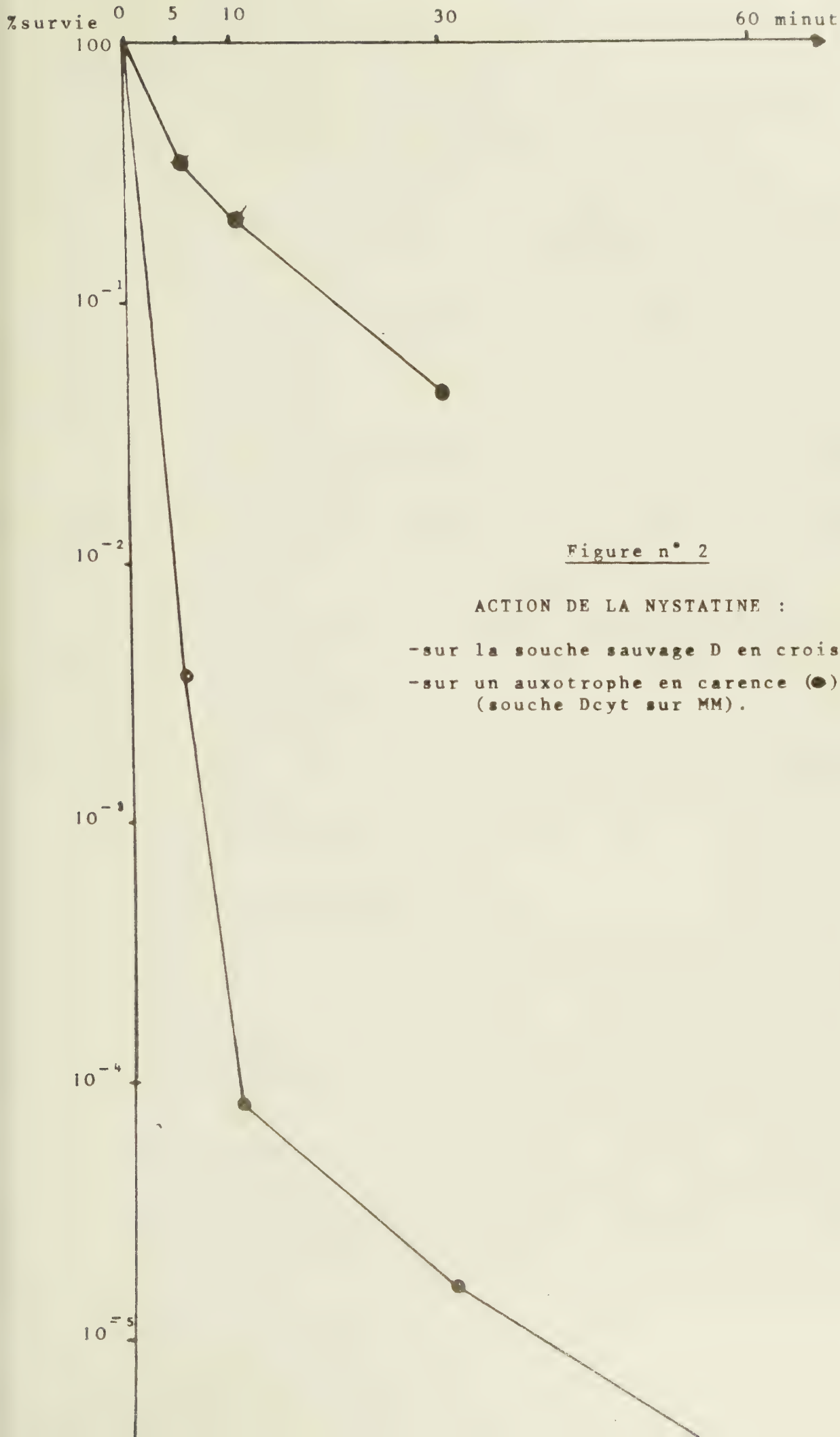


Figure n° 2

ACTION DE LA NYSTATINE :

-sur la souche sauvage D en croissance (o)

-sur un auxotrophe en carence (●)
(souche Dcyt sur MM).

- le mutant D met⁻/cyst⁻ a son besoin complémenté par la méthionine ou la cystéine. Il se peut qu'il soit bloqué dans l'incorporation des sulfates, ou qu'il corresponde à une double mutation se rapportant aux loci cys A et cys D décrits dans le métabolisme de la méthionine et de la cystéine chez *A. nidulans* par Stepien et al (1975).

  On a induit une autre mutation cys⁻ dans D met; il s'agit d'un bloc à une autre étape de la biosynthèse de la cystéine.

- Le mutant C cyt⁻ade⁻ pousse mal sur MM + cyt + ade (50 mg/l) Il y a vraisemblablement intéraction au niveau de l'entrée des bases comme décrit par Polak et Grenson (1973) sur *C. albicans* et par Jund (1973) sur *S. cerevisiae*, la cytosine et l'adénine étant transportées par un système commun.

  D'autre part il y a une inhibition par l'ammonium, car on a pu diminuer le temps de latence en réalisant la culture sur MMN_{500}. On a donc utilisé pour les répliques ce milieu additionné de cytosine et d'adénine.

On voit donc en conclusion que l'emploi de l'enrichissement à la nystatine a apporté une nette amélioration de la possibilité d'induction de mutants.

d) Etude des mutants obtenus

- Pour les raisons soulignées plus haut, il convenait de tester si les mutants obtenus après enrichissement n'étaient pas résistants à la nystatine. La majorité d'entre eux sont sensibles, ainsi que le montrent les courbes de survie à la nystatine (fig.3). On a éliminé les mutants D met⁻ pro (1) et (2), D met⁻ade⁻ (3) plus résistants que la souche sauvage; d'autre part, entre D met⁻his⁻ (1) et D met⁻his⁻(3), on a choisi celui qui a le taux de réversion le plus faible (his⁻(1)), désormais appelé D met⁻his⁻. Le mutant D met⁻ade⁻(6) rouge, est appelé Dmet⁻ade⁻.

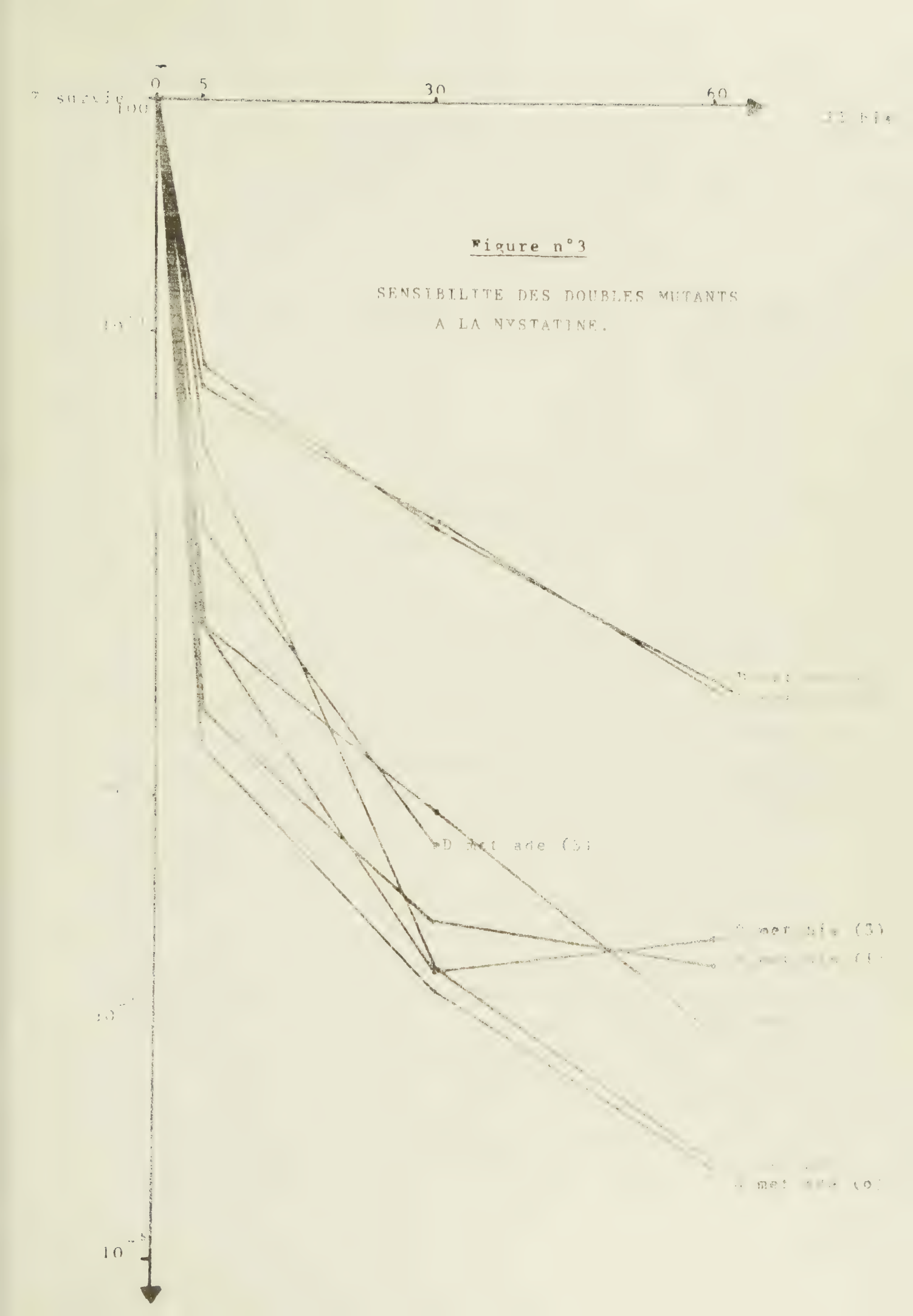


Figure n°3

SENSIBILITE DES DOUBLES MUTANTS
A LA NYSTATINE.

- La vitesse de croissance des divers mutants sur YEA est toujours plus faible que celle des souches sauvages correspondantes. Nous n'avons testé les croissances que sur les souches C et D (voir fig. 4 et 5).

  Les temps de génération sont les suivants :

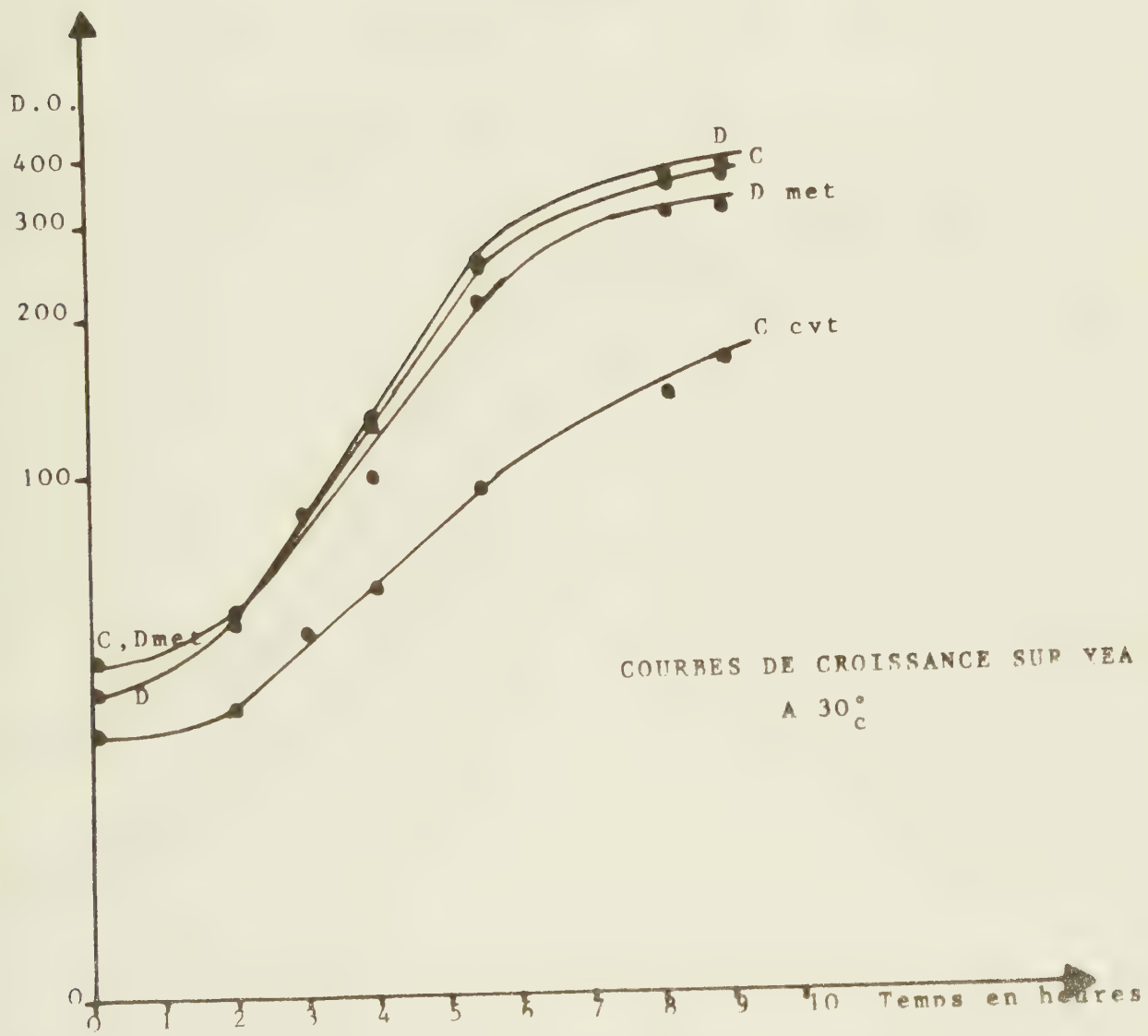
Souches	Temps génération sur YEA	Souches	Temps génération sur YEA
C	1 H.36	D met^-	1 H.45
C cyt^-	2 H.48	D met^-his^-	2 H.05
C cyt^-ade^-	4 H.	D met^-lys^-	2 H.20
D	1 H.30	D met^-ade^-	2 H.25

  On constate que la deuxième mutation se traduit toujours par un retard supplémentaire.

5. Haploïdisation à la p-FPA

L'effet haploïdisant de la DL-para-fluorophénylalanine a été signalé pour la première fois par Morpurgo (1961) sur *Aspergillus nidulans*. Comme décrit génétiquement par Lhoas (1961) et cytologiquement par Biesele et Jacquez (1954) et Lhoas (1962), il semble qu'elle agisse en provoquant une élimination successive de chromosomes jusqu'au niveau haploïde. Certains auteurs ont pu, par ce moyen, localiser des gènes dans des groupes de linkage chez *Aspergillus nidulans* (Mac Cully et Forbes 1965) et *Aspergillus niger* (Lhoas 1967). Notre hypothèse de travail, suggérée par les courbes de survie aux rayons γ, la faible induction de mutants sans enrichissement, et les résultats de certains croisements (cf.III), a été que les souches pouvaient ne pas être haploïdes, mais diploïdes ou même être à un niveau de ploïdie supérieur à 2 n. Sur certains organismes, comme *A. nidulans* (Srivastava et Sinha 1975) la pFPA est très toxique, chez d'autres elle ralentit seulement la croissance et abaisse le niveau du plateau (Lhoas 1961 et 1968). Sur *Candida tropicalis* il n'y a pas d'effet sur le temps de génération à 7 g/l de pFPA, mais abaissement du plateau (fig.6).

Figure n°4



COURBES DE CROISSANCE SUR YEA
A 30°C

Figure n°5

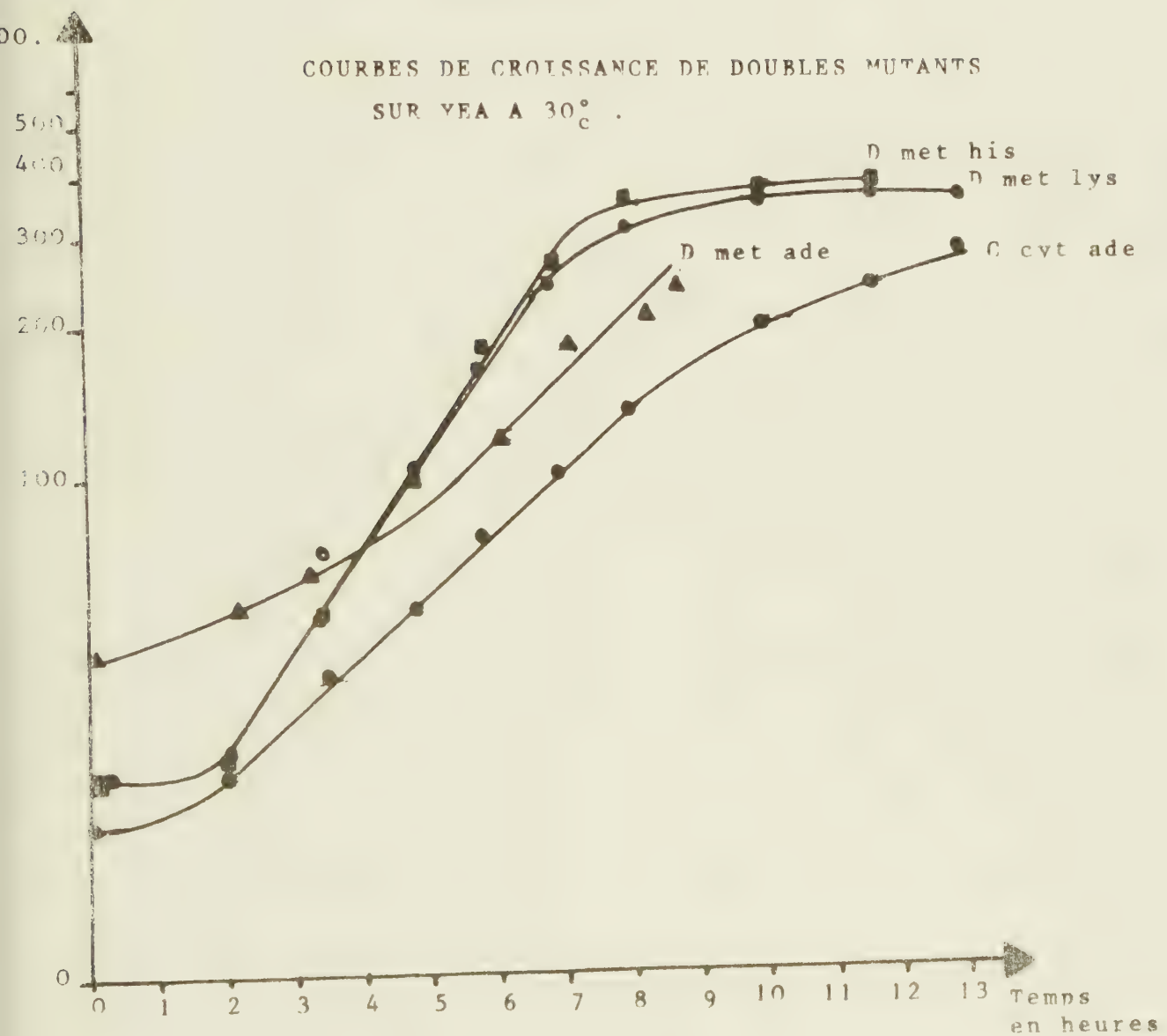
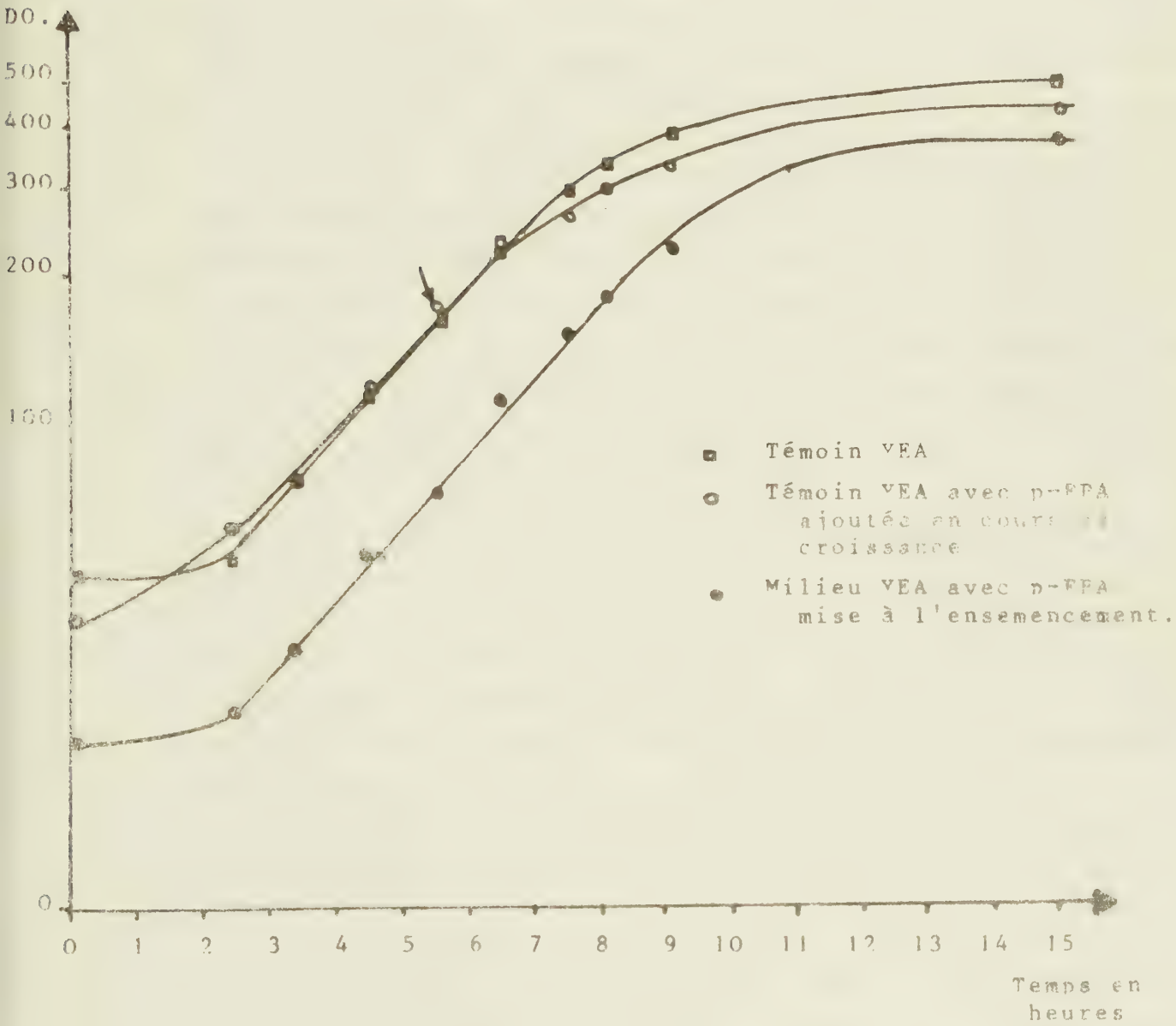

COURBES DE CROISSANCE DE DOUBLES MUTANTS
SUR YEA A 30°C .
D met his
D met lys
D met ade
C cyt ade
500
400
300
200
100
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
Temps
en heures

Figure n°6

INFLUENCE DE LA p-FPA SUR LA CROISSANCE.



L'effet sur la morphologie coloniale et cellulaire est très net. Quand on cultive pendant deux jours des cellules sur un milieu liquide agité YEA + pFPA, puis que les cellules sont étalées sur un milieu solide de même composition, on observe des colonies de tailles variées. Les petites colonies contiennent des cellules de petite taille en plus grand nombre que les grandes colonies. Si l'on réalise un isolement des petites cellules par micromanipulation, on obtient des colonies de petite taille, contenant de petites cellules et des bouquets de filaments très grêles (photos 4 et 5). Les cellules de petite taille peuvent également être observées dans les cultures en milieu liquide : sur YEA ces cellules (photo 6) ne germent pas après isolement par micromanipulation, alors qu'il y a environ 100% de germination à partir des petites cellules formées sur YEA + pFPA (photo 7), qui sont d'ailleurs plus nombreuses. On peut donc penser que ces dernières sont induites par la pFPA. Cet effet sur la taille a été déjà observé sur *Ustilago* (Day et Jones 1966), sur *A. niger* (Lhoas 1968) et aussi sur *C. tropicalis* par Gaillardin et Heslot (1971). A la différence de ces derniers, nous n'avons pas constaté d'effet toxique notable de la pFPA, mais comme eux nous avons observé une grande instabilité des formes morphologiques petites qui reprennent rapidement une taille normale.

Pour tester l'effet haploïdisant de la pFPA, nous avons opéré de trois manières: (1) D'une part nous avons cherché à voir si sur des cellules "haploïdisées" on avait une augmentation de la fréquence d'apparition des mutations. Nous n'avons pas observé d'effet (taux de mutation $8,6 . 10^{-5}$), mais nous avons choisi une souche (D) dont le taux de mutation est faible (une précédente mutagénèse sur 13600 colonies n'avait donné aucun mutant). (2) D'autre part nous avons testé l'influence de la pFPA sur la fréquence d'obtention de produits de fusion dans les méthodes de croisements dites classiques (cf. I, 4). On obtient un nombre de produits de fusion du même ordre avec ou sans haploïdisation préalable. (3) Toutefois l'effet haploïdisant de la pFPA, contestable sur la base des résultats des ségrégations étudiées dans la 3ème partie, a été confirmé par l'expérience suivante : un

prototrophe (C cyt⁻ade⁻, D met⁻lys⁻) a subi cinq jours de traitement en milieu YEA + pFPA (7 g/l) liquide; après étalement, on a trouvé 26 ségrégants sur 370 colonies, soit 7%. Quand on réalise la même expérience sans pFPA, et sur 600 colonies, on n'observe aucun ségrégant.

En conclusion de ces trois types d'expériences on peut penser que la pFPA a un effet haploïdisant, mais que les conditions de réalisation des expériences (1) et (2) n'ont pas permis de mettre en évidence, peut-être en raison d'une très grande instabilité de l'état haploïde.

6. Recherche de chlamydospores

Les chlamydospores ont été depuis longtemps mises en évidence chez l'espèce voisine *Candida albicans* (Robin 1853, Okabe 1929) et elles sont considérées comme un critère taxonomique pour cette espèce par Van Uden et Buckley (Lodder 1970). Ces formes cellulaires se définissent comme sphériques, plus volumineuses que les autres cellules, à parois épaisses et contenu hyalin. Un certain nombre d'auteurs, au cours de recherches sur *C. albicans*, ont trouvé incidemment des chlamydospores dans *C. tropicalis* qu'ils prenaient pour l'espèce témoin (Benham 1931, Windisch 1940, Pollack et Benham 1957, Walker et Hupert 1960, Juley et al 1962, Duncan et Floeder 1963, Müller et al. 1967). Hasenclever (1971) a noté aussi à la suite de Polack et Benham (1957) que les chlamydospores de *C. tropicalis* sont un peu différentes de celles de *C. albicans* : elles se forment toujours à l'extrémité des filaments et non latéralement; elles ont une paroi moins épaisse et sont moins réfringentes.

Nous avons trouvé deux types de chlamydospores: les unes libres et les autres se formant effectivement à l'extrémité des filaments.

a) Les chlamydospores libres ont été trouvées :

- dans des colonies prototrophes issues de la fusion d'auxotrophes. Elles sont entourées d'un bouquet de cellules dont certaines semblent être le produit de leur germination,

tandis que la plupart sont des cellules simplement accolées, comme l'affirment Bakerspigel et Burke(1974), (photos 13 et 14).

- Sur différents milieux liquides ou solides (en particulier V8, milieu au riz) laissés 17 H. à 25°C, puis mis à 9°C comme proposé par Hasenclever (1971).
- Sur milieu YEA liquide épuisé (plusieurs jours de culture) (photo 10). Parfois certains noyaux des chlamydospores ne se colorent pas. En fait elles n'ont en général pas perdu la capacité à germer sur V8 ou sur malt (photo 11) en donnant des figures analogues à celles décrites par Van der Walt (1970) et Sukroongreung et de Miranda (1973).

b) Les chlamydospores typiques se trouvent à l'extrémité de filaments.

- Nous avons utilisé le milieu solide au riz à 20°C. L'observation se fait en écrasant entre lame et lamelle un fragment de culture sur gélose, car les filaments s'enfoncent dans la gélose. On en a observé dans des produits de fusion, et également dans les parents auxotrophes A ade$^-$, A nicot$^-$ et les souches sauvages A et D (photo 12).
- En milieu liquide V8 ou malt à 25°C, sans agitation, on observe la formation d'un culot cellulaire sans chlamydospores, et l'apparition d'un voile en surface, très résistant mécaniquement parce qu'intensément filamenteux. On y voit des chlamydospores, éventuellement libres, dans les 4 souches parentales, mais surtout chez A et D. Sur les milieux de Fowell de Dodge, à l'acétylglucosamine. La croissance est moins bonne que sur V8 et malt, et on observe moins de chlamydospores. On en a observé quelques unes dans certains produits de fusion.

En conclusion, il semble qu'une grande variété de milieux permettent la production de chlamydospores, mais en règle générale dans des conditions défavorables à la croissance (milieux pauvres, température basse, épuisement du milieu). La présence de chlamydospores aussi bien dans les souches sauvages que dans les produits de fusion peut s'interpréter de plusieurs manières :

../..

a) ou bien ces formes sont des spores dormantes, formes de résistance, dont les noyaux ont le même degré de ploïdie que les cellules végétatives.

b) ou bien elles représentent une étape dans un cycle sexuel faisant alterner deux niveaux de ploïdie.

Il serait peut-être utile de les micromanipuler dans les prototrophes résultant de la fusion de doubles mutants auxotrophes et d'étudier le produit de leur germination. Cependant, comme on va le voir dans la 3ème partie, il était préférable, pour réaliser cette expérience, d'avoir établi au préalable les conditions de stabilité des produits de fusion.

En conclusion de ce chapitre, on doit souligner l'intérêt de la méthode de sélection d'auxotrophes à la nystatine et noter que certaines données (courbes de survie aux rayons γ, effet de l'haploïdisation à la pFPA) suggèrent un degré de ploïdie plus élevé que l'haploïdie pour les souches de *Candida tropicalis* étudiées. L'utilisation des mutants dans des croisements fournira plus de renseignements.

III. FUSION D'AUXOTROPHES ET ETUDE DES SEGREGATIONS

L'objectif principal des travaux rapportés dans ce chapitre est de chercher d'une part à obtenir des prototrophes à partir de souches marquées génétiquement, d'autre part à montrer qu'il s'agit bien de produits de fusion en récupérant les marqueurs introduits. Enfin on cherchera à voir s'il s'est produit de la recombinaison entre ces différents marqueurs.

1. Croisements préliminaires

a) Parmi les mutants auxotrophes simples induits dans les souches A, B, C et D, nous avons d'abord éliminé ceux qui présentaient un taux de réversion trop élevé. Nous les avons ensuite combinés deux à deux de toutes les façons possibles. Sur les confrontations ainsi réalisées sur MM, plusieurs se sont avérées inutilisables pour des raisons diverses : ainsi il y a syntrophie dans les croisements D cyt$^-$ x C cyt$^-$/ura$^-$(1) et D cyt$^-$ x C cyt$^-$/ura$^-$(2); d'autre part, dans le croisement C cyt(1) x C cyt$^-$(2), le nombre de colonies qui apparaissent n'est pas supérieur à ce que l'on trouve dans les boîtes MM des deux souches parentales isolées servant de témoins. Il se peut que cyt$^-$/ura$^-$(1) et cyt$^-$/ura$^-$(2) soient allèles.

Nous n'avons dénombré les colonies que trois jours après l'ensemencement, mais des colonies peuvent apparaître ultérieurement. Les croisements ont été réalisés selon la méthode de "collage" décrite au paragraphe I, 4). Les trois combinaisons suivantes ont d'abord été étudiées : A leu$^-$ x C cyt$^-$(1), A leu$^-$ x C cyt$^-$(2) et A leu$^-$ x D cyt$^-$. Elles ont en commun le parent A leu. Si l'on compare les boîtes témoins (parents) et les boîtes de confrontations (photos 15 et 16), on constate que le nombre de colonies de petite taille dans les dernières est plus élevé. Une cinquantaine ont été testées : la plupart se sont avérées être leu$^-$

../..

mis à part quelques prototrophes. Ces derniers poussent sur MM après réplique, deux sont apparus dans la confrontation A leu$^-$ x C cyt$^-$(1) et ont été notés I et II, et un dans A leu$^-$ x C cyt$^-$(2), noté III. D'autres prototrophes ont été obtenus dans le croisement A leu$^-$ x D cyt$^-$.

Avec le mutant A ade-(rouge), nous avons également, bien que le marqueur soit "leaky", pu obtenir des prototrophes blancs sur un fond de croissance rouge (A ade$^-$, A nicot$^-$)$_1$, (A ade$^-$, A nicot$^-$)$_2$, et (A ade$^-$, C cyt$^-$(2)).

Pour sélectionner les produits de fusion, nous avons utilisé l'aptitude à former des colonies isolées sur MM. Comme nous le verrons par la suite, le choix de ce critère entraîne la perte d'une partie des prototrophes (cas des dicaryons instables sur MM).

Nous avons caractérisé ces produits de fusion sur plusieurs plans .

α. Morphologie et croissance

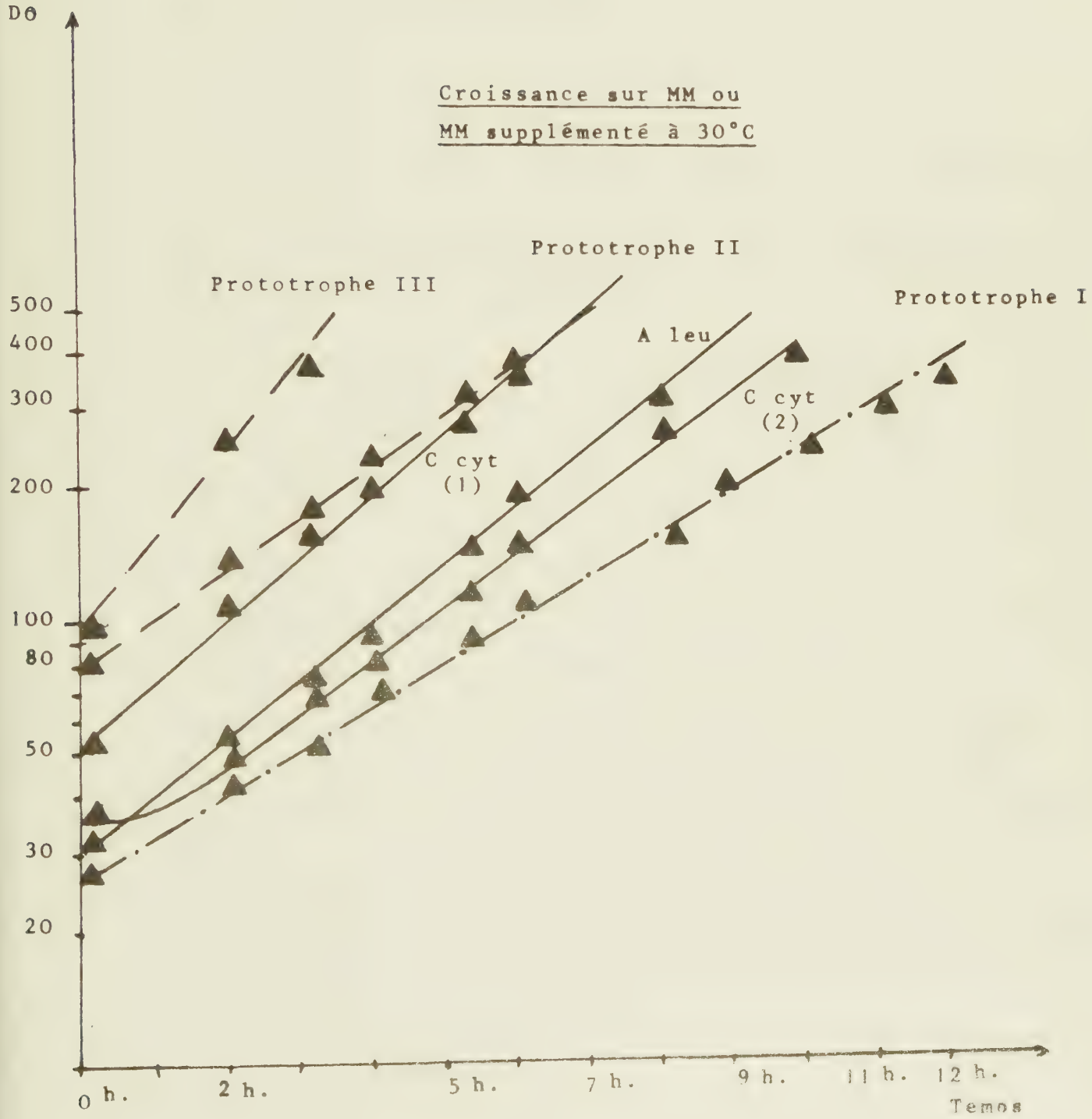
Les courbes de croissance des parents et des prototrophes sont indiquées sur la fig.7. Sur milieu minimum, supplémenté ou non, les temps de génération sont les suivants :

Souches		Temps de génération	Milieux
Parents	(A leu$^-$	2 H.20	MM + leu 50 mg/l
	(C cyt$^-$(1)	2 H.10	MM + cyt 50 mg/l
	(C cyt$^-$(2)	2 H.20	MM + cyt 50 mg/l
Prototrophes	(I	3 H.30	MM
	(II	2 H.40	MM
	(III	1 H.30	MM
Parents Sauvages	A	1 H.05	MM
	C	1 H.25	MM

../..

Figure n° 7

Croissance sur MM ou
MM supplémenté à 30°C



Seul le prototrophe I se distingue des parents par une croissance plus lente. Il est également le seul à avoir une morphologie différente, avec des cellules plus grandes et plus allongées.

Nous avons mesuré la largeur et la longueur de 25 cellules de I et de 90 cellules des souches parentales prises sur les milieux ci-dessus au même stade physiologique (même D.O.). On a ensuite calculé :

- la moyenne de la longueur et de la largeur (cellules assimilées à des sphères)
- le produit $\pi \frac{L\ l^2}{4}$ (cellules assimilées à des cylindres).

Dans chaque cas on a fait le rapport de la valeur trouvée pour le prototrophe à la moyenne des valeurs des deux parents. Les résultats sont les suivants :

Prototrophes	$\frac{L + l}{2}$	$\pi \frac{L\ l^2}{4}$
I/ A leu$^-$ + C cyt$^-$(1)	1,41	1,74
II/ A leu$^-$ + C cyt$^-$(2)	0,97	0,85
III/ A leu$^-$ + C cyt$^-$(2)	0,94	0,87
Valeur théorique	1,26	2,00

A nouveau, seul le prototrophe I diffère des parents. Les valeurs théoriques indiquées dans le tableau correspondent à l'hypothèse d'un doublement du volume dû à un passage 2n → 4n. Il existe un écart non négligeable entre les valeurs réelles et théoriques, mais il faut noter qu'on ne peut réellement assimiler les cellules rigoureusement à des sphères ou à des cylindres. Il n'est donc pas exclu que le prototrophe I ait un degré de ploïdie plus élevé que les souches parentales.

../..

Enfin on a trouvé dans des cultures diverses (entre autres MM) du prototrophe I des structures cellulaires qui ne sont pas sans rappeler des basides (photos 17 et 18). De telles configurations ont été déjà observées par A. Ermine (1975). Nous avons isolé au micromanipulateur une trentaine de ces structures mais elles sont tout au plus capable de subir 1 ou 2 divisions. Peut-être s'agit-il de figures anormales de bourgeonnement, observées d'ailleurs parfois dans les souches parentales elles-mêmes.

Nous avons cherché aussi à induire la sporulation du prototrophe I sur les milieux classiquement utilisés dans ce but (Dodge, Fowell, N-acétylglucosamine, malt..). On observe une grande diversité de tailles et des formes cellulaires, et il est en conséquence difficile de conclure.

ß. Génétique

Nous avons recherché si les prototrophes I, II et III possédaient les marqueurs d'auxotrophie des parents à l'état hétérozygote. Dans ce but, les prototrophes ont été soumis à une irradiation par les rayons γ, supposés induire cassures ou pertes de chromosomes et/ou recombinaison.
Le prototrophe III n'a donné aucune ségrégation. Cette observation, jointe aux précédentes concernant ce prototrophe permet de penser qu'il s'agit d'un révertant authentique d'une des deux souches parentales.

En ce qui concerne le prototrophe I, nous avons d'abord essayé plusieurs doses de rayons γ. La dose de 50 Krad s'étant avérée efficace pour l'induction de ségrégants, nous avons réalisé une expérience de plus grande ampleur : sur 56650 colonies, nous avons obtenu 1320 ségrégants auxotrophes, soit 2,3°/₀₀. Tous ces auxotrophes sont cyt⁻ (et aucun leu⁻). Il est important de noter cependant qu'il y a également ségrégation dans le témoin non irradié, avec une fréquence d'auxotrophes du même ordre de grandeur.

../..

D'autre part nous avons aussi réalisé des traitements par la pFPA, substance connue pour ses propriétés haploïdisantes. Les expériences ont été faites sur un milieu complet solide additionné de pFPA (7 g/l) sur lequel on a étalé environ 100 cellules. On a prélevé les petites colonies, puis on les a sous-clonées afin de les tester pour la présence d'auxotrophes. Toutes les colonies obtenues à partir de I, II en contenaient: ils étaient tous cyt$^-$. On a également récupéré des ségrégants ade$^-$ dans le prototrophe (A ade$^-$, C cyt$^-$(2)).

Talmud et Lewis (1974) ayant mis en évidence un effet mutagène de la pFPA chez *Coprinus lagopus*, nous avons traité la souche A leu$^-$ par cette substance, mais nous n'avons constaté aucune augmentation du taux de réversion.

De ces deux types d'expériences (γ et pFPA), comparées à leurs témoins, il ressort que l'apparition du marqueur cyt$^-$ n'est pas due à un effet mutagène des rayons γ ou de la pFPA: il s'agit bien de la ségrégation du marqueur parental. Pour expliquer la réapparition d'un seul marqueur d'auxotrophie, on peut formuler les hypothèses suivantes :

- la fusion a eu lieu entre un parent auxotrophe et une réversion de l'autre parent, ou bien la réversion d'un des marqueurs s'est produite après la fusion. Ceci est en accord avec le fait que le marqueur leu$^-$ réverse 10 fois plus que le marqueur cyt$^-$.

- Le prototrophe prend naissance par un apport inégal des deux parents. Il peut donc être hétérozygote pour un marqueur d'auxotrophie seulement.

- L'effet des rayons γ est de favoriser des phénomènes de recombinaison. Dès lors, s'il s'agit d'un crossing-over somatique, la fréquence d'apparition d'un marqueur d'auxotrophie à l'état homozygote dépend de la distance du gène au centromère. Mais on voit mal alors pourquoi dans les prototrophes I et II on a récupéré des ségrégants cyt$^-$ et non dans la souche (A ade$^-$, C cyt$^-$(2)). D'autre part le traitement à la pFPA devrait permettre de récupérer les deux marqueurs, ce qui n'est pas le cas.

- Le prototrophe peut être instable et perdre spontanément des chromosomes au cours des mitoses. Un tel phénomène a été décrit chez *Saccharomuces cerevisiae* (Naumov et Kondratieva 1974).

- Comme cela existe également chez cet organisme, nos souches pourraient être aneuploïdes : diploïdes monosomiques (cf. Bruenn et Mortimer 1970) ou haploïdes disomiques (Campbell et al 1975). Dans ce dernier cas, les auteurs ont montré qu'il pouvait y avoir des pertes de chromosomes associées à un échange génétique mitotique préalable dans le disome. De toutes façons l'aneuploïdie pourrait expliquer qu'un type puisse être retrouvé plus fréquemment qu'un autre.

On peut donc dire qu'on a obtenu des prototrophes hétérozygotes pour un marqueur. Aucune conclusion ne peut être avancée concernant la présence de l'autre marqueur, tant qu'il ne réapparaît pas avec une fréquence non négligeable par rapport à son taux d'apparition après mutagénèse. Il était intéressant de changer une des souches employées pour éliminer un éventuel effet d'incompatibilité entre souches due à l'existence de "mating types" par exemple.

b) Influence de pFPA et d'autres milieux sur la conjugaison

Nous avons utilisé le croisement C cyt(1) x D met pour ces essais. L'hypothèse de départ était que les souches parentales pouvaient être, comme suggéré ci-dessus, diploïdes (ou avoir au moins une fraction de leur génome diploïde). Cette hypothèse reposait sur les observations faites lors du traitement à la pFPA : il apparaît des clones ayant des cellules de petite taille (cf. II, 5) qui redonnent rapidement des cellules de taille normale. Cela laissait supposer la séquence $2n \xrightarrow{pFPA} n \dashrightarrow 2n$ l'état haploïde étant très instable. On pouvait se demander si un traitement préalable des souches par la pFPA ne produirait pas des haploïdes ayant une plus grande capacité à conjuguer. L'expérience a été réalisée comme suit :

../..

- Culture des auxotrophes pendant 2 jours sur YEA + pFPA liquide.
- Mélange des cellules ainsi traitées sur milieu liquide frais YEA + pFPA et culture, pendant 5 jours.
- Lavage et étalement sur MM.

Les témoins ont consisté d'une part en un mélange des auxotrophes sur MM sans traitement par pFPA; d'autre part en un traitement des souches parentales par la pFPA, suivi d'un étalement direct sur MM.

Nous n'avons pas observé de différences significatives entre ces trois types d'essais. L'absence d'effet de la pFPA ne signifie pas nécessairement que ce composé ne provoque pas d'haploïdisation. En effet le retour de l'état haploïde à l'état diploïde peut se produire par la fusion intracellulaire de deux noyaux issus d'une mitose et non par coniugaison entre cellules : dans ce cas on ne peut améliorer la fréquence d'obtention de prototrophes qui reste faible ($5 . 10^{-8}$).

En revanche on a pu accroître cette fréquence en utilisant les milieux de coniugaison RG, MC, YM : avec les mêmes souches parentales, on en a obtenu environ $6 . 10^{-7}$; d'autre part les prototrophes apparaissent plus rapidement (moins de 13 jours au lieu de 17 à 20 jours).
Il conviendrait de répéter ce type d'essais en quantifiant plus précisément les résultats (nombre de cellules mises en présence, nombre de cellules viables étalées...).

Dans ces expériences, nous avons isolé une cinquantaine de prototrophes qui ont été classés en 4 groupes selon leur vitesse de croissance : rapide, moyen, lent, très lent. Deux prototrophes de chaque groupe ont été cultivés sur YEA, puis étalés sur YEA et MM pour juger de leur capacité à ségréger des auxotrophes. Nous avons constaté que les prototrophes à croissance rapide ne ségrègent pas et un traitement par pFPA est sans effet : ce sont sans doute des révertants. En revanche, les prototrophes à

../..

croissance moyenne ou lente ségrègent assez activement:

- l'un d'entre eux a fourni, après passage sur pEPA, 193 met⁻ et 1 cyt⁻ sur les 194 auxotrophes traités. Ces derniers représentaient 63% du total des colonies.

- Tous les autres prototrophes ne donnent que des ségrégants met⁻ en fréquence élevée (de 40% à 99%).

Ces résultats nous suggèrent deux remarques :

- D'une part le déséquilibre entre la réapparition des divers marqueurs pourrait s'expliquer par des fréquences différentes de pertes de chromosomes portant les gènes correspondants. Ainsi on pourrait récupérer le phénotype cyt⁻, avec une fréquence faible, variant de 3°/₀₀ à 2% (voir ci-dessus) et le marqueur met⁻ dans plus de 40% des cas. On pourrait ainsi chercher à établir des histogrammes des fréquences de ségrégation pour chaque locus.

-Mais d'autre part la ségrégation si aisée sur YEA de la plupart des prototrophes pourrait plus vraisemblablement s'expliquer par la présence d'un état hétérocaryotique. Nous allons voir que l'interprétation des ségrégations des produits de fusion de protoplastes fait intervenir les deux types d'hypothèses, parce que l'état dicaryotique est suivi de la caryogamie donnant ainsi un état instable.

2. Etude de l'instabilité des produits de fusion

La fréquence d'obtention de prototrophes à partir d'auxotrophes étant très faible, nous avons pensé l'augmenter en réalisant des protoplastes et en les faisant fusionner sous l'effet de PEG.

La préparation de protoplastes de *Candida tropicalis* a été réalisée par Yamamura et al (1975) avec l'enzyme d'*Arthrobacter* et par Lebeault et al (1969) avec l'enzyme extrait d'*Helix pomatia*. La méthode utilisée au laboratoire préconise l'emploi de dithiothreitol pour un prétraitement des cellules qui facilite l'attaque de l'enzyme.

On a ainsi obtenu un taux de conversion en protoplastes de 100%. Après fusion au PEG et régénération, la survie est de 20 à 50% suivant les expériences (dans un croisement D cyt⁻ x D met⁻lys⁻). Parmi les cellules régénérées, on a pu obtenir une fréquence de prototrophes de $3 . 10^{-5}$.

Cette méthode a été appliquée au croisement D met⁻ x D cyt⁻, donc entre auxotrophes de la même souche D. Après développement sur MM, chaque colonie prototrophe est d'abord cultivée sur YEA, puis testée quant à l'existence d'une ségrégation. Dans une première expérience, 13 prototrophes ont été isolés de cette façon. Toutes les souches qui ont ségrégé (11 sur 13) ont fourni des auxotrophes met⁻ dans une proportion variant de 7% à 99%. On a réalisé deux types d'expériences : des cultures sur YEA et des cultures sur MM. Dans les deux cas, on a procédé de la manière suivante :

- 8 jours après l'obtention des prototrophes, on les a cultivé sur YEA (respectivement MM), puis on a déterminé le pourcentage d'auxotrophes dans les cultures.
- Après 1 mois de séjour à température ambiante sur leur MM d'isolement, les prototrophes ont été prélevés à nouveau· on a réalisé une suspension cellulaire à partir de laquelle on a fait 5 gouttes sur YEA (respectivement 4 gouttes sur MM). Puis on a déterminé le pourcentage d'auxotrophes au sein de chaque goutte. Ces pourcentages sont les suivants :

	Prototrophes	n°2	n°5
Passages de 2 jours sur YEA	Après 8 j. sur MM	80%	99%
	Après 1 mois sur MM (5 répétitions sur YEA)	30% 27% 28% 28% 30%	99% " " " "
Passages de 2 j. sur MM	Après 8 j. sur MM	55%	90%
	Après 1 mois sur MM (4 répétitions sur MM	25% 17% 18% 10%	80% 94% 85% 85%

../...

Dans tous les cas il y a homogénéité entre les diverses gouttes sur chaque milieu.

Que ce soit après les passages sur VEA ou sur MM, on constate dans la plupart des cas une diminution du pourcentage d'auxotrophes obtenus. Le fait qu'il y en ait encore dans la dernière expérience mentionnée suggère que la ségrégation a lieu encore sur MM, mais à une moins grande échelle qu'au moment de l'obtention des prototrophes.

Ces résultats laissent supposer que les prototrophes peuvent être stabilisés, ce qui a été effectivement réalisé : on a obtenu des clones ne ségrégeant plus.

La durée du séjour d'un prototrophe sur MM a une influence déterminante sur la stabilité, comme l'indiquent les deux observations suivantes :

- Quand on prélève, dès leur apparition, les microcolonies prototrophes issues d'une confrontation et qu'on les repique sur MM solide, il arrive qu'on en perde jusqu'à 30% qui ne repoussent pas. On peut réduire cette perte à 3 ou 4% en attendant 5 ou 6 jours.

- Une série de prototrophes obtenus au cours de la répétition de ce même croisement D cys⁻ x Dmet⁻ a été conservée 5 à 6 semaines sur MM. On a observé des pourcentages variables de ségrégants met⁻. On remarque que 40% des prototrophes ségrègent moins de 20% d'auxotrophes et que 30% sont presque stabilisés (moins de 1% de ségrégants).

A ces résultats, on peut proposer l'interprétation suivante : Les produits de fusion seraient hétérocaryotiques et on ne peut s'attendre à ce que leur stabilité soit totale. La stabilisation correspondrait à la fusion des noyaux, comme attesté par les études caryologiques, révélant des cellules uninucléées chez les prototrophes stables (photo n° 1º). Il est probable

../..

que les noyaux d'un hétérocaryote ne peuvent fusionner que dans certaines circonstances, telle que l'entrée simultanée en mitose. Une culture de longue durée sur MM devrait augmenter les chances d'observer cet évènement. Les éventuels auxotrophes produits doivent finir par mourir sur MM, ce qui expliquerait aussi la diminution du pourcentage de ségrégants observés. Si on prélève les produits de fusion dès leur apparition, la stabilisation n'a souvent pas eu le temps de se produire, et on récupère essentiellement des auxotrophes, d'où la perte sur MM.

Nous avons vérifié que les prototrophes obtenus par la méthode classique présentaient également la même possibilité de stabilisation. Certains donnaient au départ 99% d'auxotrophes; après plusieurs clonages successifs, ils fournissent 100% de prototrophes. Le premier prototrophe étudié (I) ne ségrège pas, mais ayant été conservé longtemps sur MM, il est sans doute stabilisé.

On peut se demander ce que deviennent les hypothèses formulées plus haut (cf III, 1.)
Le rôle joué par le niveau de ploïdie n'est pas incompatible avec ce nouveau modèle, surtout quand on constate que les noyaux des prototrophes stables ont à peu près la même taille que les noyaux des souches parentales (rapport prototrophe/moyenne des parents : 1,07 à 1,1, mesuré sur 50 noyaux par souche). Ceci suggère que le noyau de fusion serait instable, ce qu'on comprend si les souches de départ sont diploïdes : le noyau à 4n chromosomes perdrait peu à peu ses chromosomes et se stabiliserait à l'état 2n.

L'hypothèse des pertes de chromosomes peut s'intégrer dans ce schéma qui rappelle un peu les fusions de cellules animales (ici par protoplastes) dans lesquelles on observe des éliminations progressives des chromosomes d'une des souches parentales (Ephrussi 1972). Ceci expliquerait la réapparition d'un seul des deux marqueurs.

La confirmation génétique de l'existence de dicaryons peut être réalisée à l'aide de doubles mutants dans chaque souche parentale: D'autre part l'emploi de doubles mutants offre la possibilité de récupérer plusieurs types de recombinants.

3. Utilisation des doubles mutants

a) Etude des ségrégations

Un premier prototrophe (D met⁻lys⁻, C cyt⁻ade⁻), nommé P_L a été obtenu par fusion de protoplastes, et cultivé une nuit sur YEA. La descendance analysée ne comporte que des auxotrophes: 28 colonies met⁻lys⁻ et 34 colonies cyt⁻ade⁻ sur 62 colonies. Ce résultat correspond bien à ce qui était attendu: les deux noyaux n'ont pas fusionné.

Nous avons cherché à voir comment se comporteraient un plus grand nombre de produits de fusion. 128 prototrophes (C cyt⁻ade⁻, D met⁻lys⁻) et 143 prototrophes (C cyt⁻ade⁻, D met⁻his⁻) ont été obtenus. Cinq prototrophes de chaque sorte ont été prélevés et la ségrégation observée après deux jours de culture sur YEA est indiquée dans les tableaux ci-dessous. Sur ces mêmes tableaux, on peut lire les résultats qui ont été obtenus sur quinze autres prototrophes de chaque type après passage pendant cinq jours sur YEA.

Cas des (C cyt⁻ade⁻, D met⁻lys⁻) :

Phénotypes		met⁻lys⁻	cyt⁻ade⁻	met⁻	lys⁻	cyt⁻	ade⁻	sauvage
2 jours YEA	nombre	127	12	0	0	0	0	1 867
	% sur le total	6,4	0,6	0	0	0	0	93
5 jours YEA	nombre	3	0	5	4	0	0	5 400
	% sur le total	0,06	0	0,09	0,07	0	0	99,78

Cas des (C cyt⁻ade⁻, D met⁻his⁻)

Phénotypes		met⁻his⁻	cyt⁻ade⁻	met⁻	his⁻	cyt⁻	ade⁻	sauvage
2 jours YEA	effectif	469	31	33	34	0	0	1 279
	% sur le total	25,4	1,7	1,8	1,8	0	0	69,3
5 jours YEA	effectif	2	2	0	4	1	1	5 400
	% sur le total	0,04	0,04	0	0,07	0,02	0,02	99,81

A propos de cette série de résultats, on peut faire les remarques suivantes :

α° Le deuxième tableau montre une récupération non négligeable des associations parentales. Ceci est encore plus net sur le premier tableau où tout type recombinant est absent. Toutefois il y a un fort déséquilibre entre les deux types parentaux: quand on se rappelle que les temps de génération de D met⁻lys⁻, D met⁻his⁻ et C cyt⁻ ade⁻ sont respectivement de 2 H.20, 2 H.05 et 4 H., on comprend qu'en 4 jours un déséquilibre apparaisse, même si au départ les auxotrophes étaient présents dans les mêmes proportions. Ceci est très net au bout de 5 jours, où dans le cas du premier tableau, le type cyt⁻ade⁻ disparaît complètement. Et on peut observer dans le deuxième tableau une diminution générale de la fréquence des auxotrophes entre le traitement de deux jours et celui de 5 jours. On met donc en jeu essentiellement les différences de temps de génération sur YEA, ce qui explique que dans le cas du prototrophe P_L on ait encore obtenu, au bout d'une nuit seulement, les deux types parentaux à peu près à égalité, la différence des valeurs sélectives ayant eu moins de temps pour s'exprimer. On peut cependant émettre une réserve parce que les temps de génération ont été mesurés en milieu liquide, et l'expérience ci-dessus sur boîte.

ß° D'autre part, un autre fait significatif est l'apparition des ségrégants recombinés met⁻, his⁻, parfois cyt⁻ ou ade⁻. Elle indique sans équivoque qu'il y a eu fusion des noyaux, pour au moins une partie des cellules.

Par ailleurs, l'étude caryologique des prototrophes réalisée dès leur apparition sur MM montre un pourcentage élevé de dicaryons (jusqu'à 28% dans une colonie C cyt⁻ade⁻, D met⁻his⁻). L'apparition d'auxotrophes se comprend étant donné la disynchronie des divisions des noyaux des dicaryons. Au cours du temps on observe moins de dicaryons du fait de l'apparition de cellules uninucléées ségrégants et produits stabilisés.

../..

b) Interprétations

Des cellules dicaryotiques avaient été observées chez *Candida tropicalis* dès 1940 par Windisch. Cette observation a été répétée dans un produit de fusion de deux auxotrophes, par E. Ermine (1975). Ces hétérocaryons ségrègent les types parentaux, ce qui est un résultat tout à fait analogue à ceux de Anné et Pederby (1976) sur des produits de fusion de protoplastes de *Penicillium* après traitement au PEG.

Mais ici, à un moment donné, a lieu la fusion et dès lors plusieurs hypothèses sont possibles :

- des pertes de chromosomes se produisent parce que le produit de fusion aurait 4n chromosomes. On redescendrait ainsi à des noyaux à 2n chromosomes.

- Des phénomènes de recombinaison (crossing-over somatiques, conversions, brassage de centromères,) ont lieu dans ces produits de fusion éventuellement diploïdes.

- Après la fusion il y aurait une méiose, mais il est étonnant qu'elle n'ait jamais été observée, et de toute façon, on devrait, dans ce cas, retrouver les vrais phénotypes recombinants. Chez *Schizophyllum commune*, Crowe (1966) a observé des échanges de gènes entre noyaux d'un dicaryon: ces noyaux passeraient par un stade de fusion fugace, qui assure le brassage génétique. Un tel système ne peut être exclu dans notre cas.

Plusieurs études pourraient éclaircir ces points :

- On pourrait faire un étalement après un passage très court sur YEA, ou bien étaler en fonction du temps pour suivre l'évolution des différents types d'auxotrophes dans la population.

- La réalisation de micromanipulation de bourgeons successifs d'un prototrophe dès son apparition et l'analyse de leurs phénotypes pourrait nous renseigner sur le processus de ségrégation.

../.

Toutefois il reste à élucider la nature du processus de stabilisation à partir du prototrophe où a déjà eu lieu la fusion nucléaire. Ceci permettrait de déterminer la constitution des produits stabilisés.

c) Etude des prototrophes stabilisés

Nous avons abordé ce problème de deux manières :

α. Nous avons soumis les souches "stabilisées" à l'action haploïdisante de la pFPA. Les résultats obtenus n'apportent pas de renseignements supplémentaires. On a observé les ségrégations suivantes :

Cas des (cyt⁻ade⁻, D met⁻lys⁻)

Phénotypes	met⁻lys⁻	cyt⁻ade⁻	met⁻	lys⁻	cyt⁻	ade⁻	+
effectif	8	0	29	31	1	0	1045
% sur total	0,74	0	2,67	0,28	0,09	0	96,22

Cas des (C cyt⁻ade⁻, D met⁻his⁻)

Phénotypes	met⁻his⁻	cyt⁻ade⁻	met⁻	his⁻	cyt⁻	ade⁻	+
effectif	2	2	0	4	2	1	700
% Sur total	0,28	0,28	0	0,56	0,28	0,14	98,46

Une hypothèse qui pourrait expliquer ces résultats serait que les ségrégants, produits de l'haploïdisation, représentent un stade très instable : ils fusionneraient au hasard. Mais on devrait alors récupérer les phénotypes recombinés, doubles auxotrophes dans une proportion égale à celle des types parentaux. Ce n'est pas ce que l'on constate, mais on ne peut exclure cette hypothèse car les effectifs examinés sont faibles et il est possible que ces types recombinés présentent un désavantage sélectif par rapport aux types parentaux sur YEA.

../..

β. Nous avons donc réalisé une deuxième approche avec un prototrophe (C cyt⁻ade⁻, D met⁻his⁻) "stabilisé". Cette souche a été soumise à une irradiation très faible de rayons γ (5 Krad): ce traitement est réputé induire de la recombinaison et il était nécessaire d'opérer à une dose recombinagène et non mutagène pour minimiser les ambiguités sur l'origine des types recombinés les plus rares. Cette irradiation a été suivie d'un enrichissement en auxotrophes par la nystatine, la seule différence avec le traitement standard étant une phase très courte d'expression sur YEA pour éviter la disparition des auxotrophes défavorisés.

Les auxotrophes de phénotypes suivants ont été obtenus :

his⁻	1 120	met⁻his⁻	136	ade⁻met⁻	2
met⁻	23	cyt⁻ade⁻	2	ade⁻his⁻	5
ade⁻	31			cyt⁻his⁻	5
cyt⁻	1			cyt⁻met⁻	0

Ce résultat représente 0,5°/₀₀ de recombinaison après irradiation. Il faudrait, pour que ce résultat soit significatif réaliser la même expérience sans irradiation.

Il est clair, d'après ces chiffres, que le prototrophe stabilisé possède encore les 4 marqueurs: tous les doubles recombinés ont été obtenus sauf met⁻cyt⁻

L'expérience doit être répétée sur un grand nombre de souches, en particulier sur des prototrophes indépendants issus du même croisement. On pourrait tester sur un grand nombre l'hypothèse de la diploïdie des souches de départ ainsi que celle d'un passage par un stade 4n instable, qui ségrègerait des produits stabilisés à 2n chromosomes. Si les ségrégations se font au hasard, on peut calculer la fréquence d'obtention de prototrophes hétérozygotes pour 1, 2, 3 ou 4 marqueurs et comparer ces fréquences attendues à celles observées : on vérifierait ainsi l'hypothèse.

../..

../..

D'autre part ces produits dits stabilisés peuvent être analysés sur des milieux de sporulation et on peut micromanipuler des formes intervenant dans une éventuelle sexualité (spores, chlamydospores.) pour en analyser la descendance. De toute façon il est établi qu'il est possible d'observer des phénomènes de recombinaison chez *Candida tropicalis*.

CONCLUSION

Nous avons pu induire des mutants chez *Candida tropicalis* en adaptant une technique d'enrichissement à la nystatine. D'autre part il a été possible de réaliser des fusions de cellules auxotrophes aboutissant à la formation de prototrophes instables. Ces derniers peuvent être stabilisés tout en conservant les marqueurs introduits, et on peut, à partir d' eux récupérer des souches recombinantes.

Cette technique présente un intérêt pour la fabrication de polyploïdes de levures, à condition que l'on puisse stabiliser les produits de fusion supposés à 4n chromosomes. On pourrait à cet effet soumettre ces cellules à des vapeurs de camphre qui accélèrent les fusions dans les hétérocaryons (Roper 1958). D'autre part la recombinaison peut être utilisée pour l'amélioration des souches industrielles.

Dans l'état actuel de nos recherches, on peut envisager plusieurs thèmes de travail:

- D'une part il serait souhaitable de faire un plus grand usage des doubles mutants. Certains en particulier n'ont pas encore été utilisés, tels D met⁻cys⁻ et D met⁻ade⁻ (qui présente l'intérêt d'être rouge).

- On pourrait essayer de sélectionner des "prototrophes partiels" sans utiliser tous les marqueurs d'auxotrophies, comme cela a été réalisé sur les cellules animales (Ephrussi 1972) et sur les produits de fusion de prototrophes de *Bacillus subtilis* (Schaeffer 1976, sous presse). Ainsi dans un croisement ab x cd, on peut sélectionner les produits de fusion poussant sur MM +a + c (ou toute autre combinaison de 2 ou 3 métabolites) dans l'espoir d'obtenir des recombinants pour les marqueurs b et d. Dans notre cas, on pourrait le réaliser pour les marqueurs de faible valeur sélective (tels que cyt⁻ et met⁻, cf.III,3. c).

../..

Un autre cas intéressant serait l'analyse de la résistance à la 5-fluorocytosine, dans les descendants des croisements réalisés avec C cyt⁻ade⁻ (qui a été induit dans une souche résistante).

- Enfin on peut se poser la question de savoir s'il existe des phénomènes d'incompatibilité entre les souches et/ou au sein d'une même souche. Certes nous avons obtenu des prototrophes (Dmet⁻, D cyt⁻), mais leurs ségrégants sont tous met⁻. La perte d'un des marqueurs est peut-être en rapport avec une incompatibilité intrasouche. Ce problème pourra être éclairci par un croisement entre doubles mutants de la souche D.

  S'il existe une incompatibilité intersouche, elle expliquerait les faibles fréquences de fusion de cellules entières. Si comme chez *Neurospora crassa* (Delange et Griffiths 1975, Hartl et al 1975), il existe deux allèles, nos souches pourraient être toutes de même signe. Ceci expliquerait la formation d'hétérocaryons. Peut-être dans cette hypothèse serit - il intéressant de croiser nos souches avec des souches de *Candida tropicalis* d'autres origines : c'est peut-être un moyen de mettre en évidence un cycle sexuel qui reste encore hypothétique.

- Des essais préliminaires de mesures de quantité d'ADN ont été réalisés par fluorescence à l'iodure de propidium. Une telle technique, ou bien l'emploi d'un microspectrophotomètre permettant de déterminer la teneur en ADN de noyaux isolés, semble prometteuse pour l'étude caryologique comparée des souches parentales, des formes à petites cellules induites à la pFPA, des dicaryons, des produits de fusion et des prototrophes stabilisés. Peut-être pourrait-on ainsi vérifier si les souches de départ sont 2n et les produits de fusion instables, 4n.

En conclusion on peut souligner que parler de phénomènes d'incompatibilité ne peut être fait que de façon très prudente au vu de nos résultats, surtout quand on sait que chez d'autres organismes ils peuvent mettre en jeu plusieurs allèles (chez *Podospora anserina*, Bernet 1967). L'étude plus détaillée des prototrophes stabilisés apportera sans doute des éclaircissements .

../..

- d'une part en étudiant leur spectre de ségrégation.
- d'autre part en les croisant entre eux ou avec les souches de départ.
- enfin en croisant entre eux des ségrégants issus du même prototrophe, de manière à remettre en jeu les 4 marqueurs d'auxotrophie parentaux, mais combinés différemment.

D'un point de vue plus pratique, on peut considérer que l'objectif recherché (obtention de recombinaison avec des caractères monogéniques) a été atteint. Il doit cependant être étendu et répété sur d'autres types de prototrophes. On peut espérer que, bien que les déterminismes soient plus souvent polygéniques pour les caractères industriellement intéressants, on puisse mettre en oeuvre les procédés décrits pour sélectionner de nouvelles souches aux performances meilleures.

BIBLIOGRAPHIE

ANNE J. & J.F. PEDERBY. 1976. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. J. Gen. Microbiol. 92, 413-417.

ARST J.R. & D. COVE. 1969. Methylammonium resistance in *Aspergillus nidulans*. J. of Bacteriology. 98, 1284-1293.

BAKERSPIGEL A. & S. BURKE. 1974. A possible function of the chlamydospores of *Candida albicans*. Mycopath. Mycol. Appl. 54 (1), 147-152.

BENHAM R.W. 1931. Certain Monilias parasitic on man. Their identification by morphology and by agglutination. J. Infect. Dis. 49, 183-215.

BERNET J. 1967. Les systèmes d'incompatibilité chez le *Podospora anserina*. C.R. Acad. Sci. 265, 1330-1333.

BIESELE J.J. & J.A. JACQUET. 1954. Mitotic effect of certain amino acid analogs in tissue culture. Ann. N.Y. Acad. Sci. 58, 1276-1287.

BOLOTIN M., D. COEN, J. DEUTSCH, B. DUJON, P. NETTER, E. PETROCHILD, P.P. SLONIMSKI. 1971. La recombinaison des mitochondries chez *Saccharomyces cerevisiae*. Bull. Inst. Past. 69, 215-239.

BRUENN J. & R.K. MORTIMER. 1970. Isolation of monosomics in yeast. J. of Bacteriol. 102 (2), 548-551.

CAMPBELL D.A., S. FOGEL & K LUSNAK. 1975. Mitotic chromosome loss in a disomic haploid of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 79 (3), 383-394.

CROWE L.K. 1960. The exchange of genes between the nuclei of a dikaryon. Heredity 15, 397-405.

DAY A.W. & J.K. JONES. 1966. Induced haploidisation in diploid cultures of *Ustilago violacea*. Microb. Genet. Bull. 25, 5-6.

DELANGE A.M. et A.J.F. GRIFFITHS. 1975. Escape from mating type incompatibility in bisexual (A+a) *Neurospora* heterocaryons. Can.J. Genet. Cytol. 17, 441-449.

DROUHET E., L. MERCIER-SOUCY, S.MONTPLAISIR. 1974. Sensibilité et résistance des *Candida* à la 5-fluorocytosine, au 5-fluorouracile et à la 5-fluorouridine. Relation avec l'écologie et le sérotype de *C. albicans*. C.R. Acad. Sci. Sér. D. 278, 605-608.

DUNCAN J. & J. FLOEDER. 1963. A comparison of media for the production of chlamydospores by *Candida albicans*. The Amer. J. of Med. Technol. 29 (4), 199-206.

EPHRUSSI B. 1972. Hybridization of somatic cells. Princeton University Press, Princeton.

ERMINE A. 1975. Etude du cycle de *Candida tropicalis*. Thèse, Fac. Sciences, Paris XI.

ERMINE A., P. FOURNIER & H. HESLOT. 1976. Use of nystatin to screen auxotrophs of *Candida tropicalis*. Antimicrob. Ag. Chemother. (soumis pour publication).

FOWELL R.R. 1952. Sodium acetate as a sporulation medium for yeast. Nature, 170, 578.

FRYBERG M., A.C. OEHLSCHLAGER, A.M. UNRAU. 1975. Sterol biosynthesis in antibiotic sensitive and resistant *Candida*. Arch. Biochem. Biophys. 173, 171-177.

GAILLARDIN C.M. 1976. Génétique de la levure *Saccharomycopsis lipolytica*. Contribution à l'étude du métabolisme de la lysine. Thèse de doctorat d'Etat. Fac. Sciences, Paris VI.

GAILLARDIN C.M., V. CHAROY & H. HESLOT. 1973. A study of copulation, sporulation and meiotic segregation in *Candida limolytica*. Arch. Mikrobiol. 92, 69-83.

GAILLARDIN C.M. & H. HESLOT. 1971. Physiological and genetical studies on yeasts of the genus *Candida*. In Radiation and Radioisotopes for industrial microorganisms. Int. Atomic Energy Agency, Vienna, 93-111.

GALLO M., ROCHE-PENVERNE et AZOULAY E. 1974. Localisation de l'alcool deshydrogénase mitochondriale de *Candida tropicalis*. FEBS Letters, 46 (1), 78-82.

GANESAN A.T. & M.S. SWAMINATHAN. 1958. Staining the nucleus in yeasts. Stain technology, 33 (3), 115-121.

HABER J.E. 1974. Bisexual mating behavior in a diploid of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for genetically controlled non random chromosome loss during vegetative growth. Offical publications of IAMS, XXIII (2), 53.

HARTL D.L., E.R. DEMPSTER & S.W. BROWN. 1975. Adaptative significance of vegetative incompatibility in *Neurospora crassa* Genetics, 81 (3), 553-569.

HASENCLEVER H.F. 1971. The consistent formation of Chlamydospores by *Candida tropicalis*. Sabouraudia, 9, 164-166.

HERMAN A.I. 1971. Mating responses in *Candida lipolytica*. J. of Bacteriol. 107 (1), 371

HERMANN H. 1967. Wirkung von Kaliumcyanid auf Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxid bildung verschiedener Arten dem Gattungen *Candida* und *Saccharomyces*. Z. allg. Mikrobiol. 7, 403-406.

HOUSSET P., M. NAGY & J. SCHWENKE. 1975. Protoplasts of *Schizosaccharomyces pombe* : an improved method for their preparation and the study of their guanine uptake. J. Gen. Microbiol. 90, 260-264.

JULEY L., H. WALCH & E. BIRD. 1962. Enriched proline-tween agar. A medium for identification of *Candida*. The Amer. J. Clin. Path. 37, (6), 664-666.

JUND R. 1973. Etude de l'utilisation et des interconversions des pyrimidines chez *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse Doctorat d'Etat, Fac. Sci. Strasbourg. Y.N. 1976.

KARASSEVITCH Y.N. 1976. The utilization of rare and unnatural pentoses by yeast *Torulopsis candida*. Biochimie 58 (1-2), 239-242.

LATARJET R. & B. EPHRUSSI. 1949. Courbes de survie de levures haploïdes et diploïdes soumises aux rayons X. C.R. Acad. Sci. 229, 306-308.

LEBEAULT J.M. B. ROCHE, Z. DUVNJAK et E. AZOULAY. 1969. Protoplasts obtained from *Candida tropicalis* grown on alkanes. J. of Bacteriol. 100 (3), 1218-1221.

LEUPOLD U. 1955. Methodisches zur Genetik von *Schizosaccharomyces pombe*. Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. 15, 1141-1146.

LHOAS P. 1961. Mitotic haploidisation by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluorophenylalanine. Nature. 190, 744.

LHOAS P. 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. Genet. Res. 10, 45-61.

LHOAS P. 1968. Growth rate and haplodization of *Aspergillus niger* on medium containing p-fluorophenylalanine. Genet. Res. 12, 305-315.

MAC CLARY D.O., W.L. NULTY & E.R. MILLER. 1959. Effects of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces*. J. of Bacteriol. 78, 362-368.

MAC CULLY K.S. et E. FORBES. 1965. The use of p-fluorophenylalanine with master strains of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. Genet. Res. 6, 352-359.

MOAT A.G., N. PETERS et AM. SRB. 1958. Selection and isolation of auxotrophic yeast mutants with the aid of antibiotics. J. of Bacteriol. 77, 673-677.

MORPURGO G., 1961. *Aspergillus* News letter n° 2, p. 10.

../..

MULLER H.L., K. KOEPPE et W. SCHIFF. 1967. Die Chlamydosporenbildung und ihre Verwendung zur Schnelldiagnostik der Sprosspilze. Zbl. Bakteriol. 203, 403-415.

NAUMOV G.I. & V.I. KONDRATIEVA. 1974. "Mating type and the chromosome loss during mitosis in diploid homothallic yeast *Saccharomyces paradoxus* G IV-51". Genetika, 10, (12),161-162

NORDSTROM K. 1967. Induction of the petite mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. J. Gen. Microbiol. 48, 277-281.

OKABE Y. 1929. Studien über den Soopilz. I Mitteilung : Bakteriologische Eigenschaften und systematische Stellung des Soorpilzes. Zentralbl. F. Bakt I, III, 181-194.

OSUMI M. F. FUKUSUMI, Y. TERANISHI, A. TANAKA & S. FUKUI. 1975. Development of microbodies in *Candida tropicalis* during incubation in a n-alkane medium. Arch. Microbiol. 103, 1-11.

PAGANO J., J.D. LEYIN de W. TREJO. 1957-1958. Diagnostic medium for differentiation of species of *Candida*. Antibiotics Ann. 6, 137-143.

POLAK A.M. & M. GRENSON. 1973. Evidence for a common transport system for cytosine, adenine and hypoxanthine in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. Europ. J. Biochem. 1973. 32 (2), 276.

POLLACK J.D. & R.W. BENHAM. 1957. The chlamydospores of *Candida albicans*: Comparison of three media for their induction. J. Lab. & Clin. Med. 50, 313-317.

PONS G., J. GUIRAUD & P. GALZY. 1975. Remarques sur les métabolismes respiratoires et fermentaires de *Candida tropicalis* BERCKHOUT. Z. allg. Mikrobiol. 15 (7), 537-545.

RAMAIAH A. 1974. Pasteur effect and phosphofructokinase.in Current Topics in cellular regulation. vol.8, Horecker & Stadtman (ed), London, 297-345.

ROBIN. 1853. Histoire naturelle des végétaux parasites qui croissent sur l'homme et sur les animaux vivants. Baillière (ed.), 488-503.

ROON R.J., H.L. EVEN, P. DUNLOP & F.L. LARIMORE. 1975. Methylamine and ammonia transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. of Bacteriol. 122 (2), 502-509.

ROPER J.A.. 1958. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8, 14-15.

SNOW R. 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic "nystatin". Nature, 211, 206-207.

SRIVASTAVA S. & U. SINHA. 1975. Six new loci controlling resistance to p-fluorophenylalanine in *Aspergillus nidulans*. Genet. Res. 25, 29-38.

STEPIEN P.P., N.J. PIENIAZEK, J. BAL, E. MORZYKA. 1975. Cysteine biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. Acta Microbiologica Polonica. Ser. A VII (24), n° 4, 201-210. ../..

STRIPPOLI V. & N. SIMONETTI. 1975. Specific induction of chlamydospore formation in *Candida albicans* by N-acetyl-D-glucosamine. Experientia 31 (1), 130-131.

SUBIK J. J. KOLAROV & L. KOVAC. 1974. Anaerobic growth and formation of respiratory deficient mutants of various species of yeast. FEBS letters, 45 (1), 263-266.

SUKROONGREUNG S. & L.R. de MIRANDA. 1973. A new aspect of the life cycle of *Candida tropicalis*. Ant. Leeuwh. J. Micr. Serol. 39 (1), 68-80.

SVIHLA G., F. SCHLENK & J.L. DAINKO. 1961. Spheroplasts of *Candida utilis*. J. of Bacteriol. 82, 808-814.

TALMUD & LEWIS. 1974. The mutagenicity of amino acid analogues in *Coprinus lagopus*. Genet. Res. 23 (1), 47-61.

TASCHDJIAN C.L. 1957. Routine identification of *Candida labicans* : current methods and a new medium. Mycologia, 49, 332-338.

TERANISHI Y., S. SHIMIZU, A. TANAKA & S. FUKUI. 1974. Comparative studies on respiratory activity and cytochrome content of *Candida tropicalis* pk 233 grown on hydrocarbon and on glucose. Agr. Biol. Chem. 38 (9), 1581-1587.

VAN DER WALT J.P. 1967. Sexually active strains of *Candida albicans* and *Cryptococcus albidus*. Ant. V. Leeuwenh. 33, 246-256.

VAN DER WALT J.P. 1970. The genus *Syringospora quinquad*. Emend. Mycopath. Mycol. Appl. 40, 231-243.

VAN DER WALT J.P. & M.J. PITOUT. Ploidy differences in *Sporobolomyces salmonicolor* and *Candida albicans*. Ant. V. Leeuwenh. 35, 227-231.

VAN UDEN N. & H. BUCKLEY. 1970. *Candida* BERCKHOUT. In the Yeasts, Lodder (ed), 893-1087.

WALKER L. & M. HUPPERT. 1960. Corn meal tween agar : an improved medium for the identification of *Candida albicans*. Am. J. Clin. Path. 33 (2), 190-194.

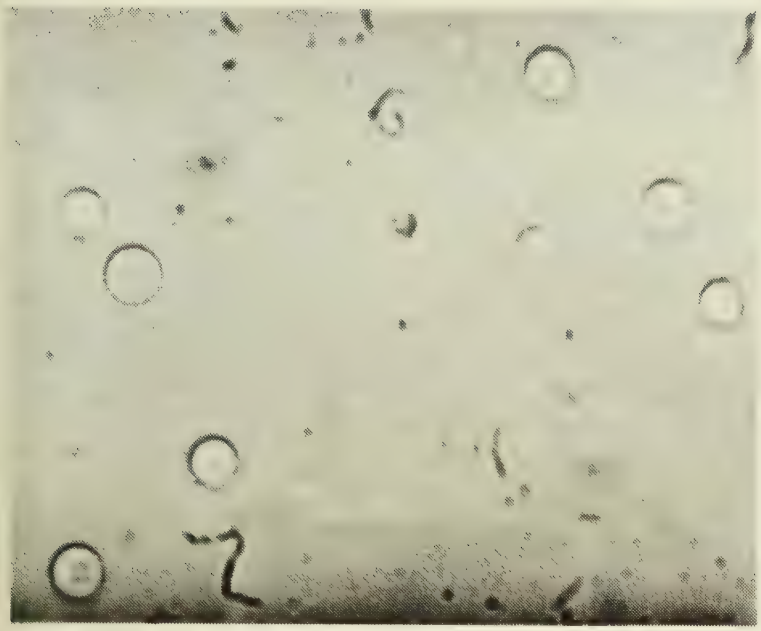
WARR J.R. & ROPER J.A. 1965. Resistance to various inhibitors in *Aspergillus nidulans*.J. Gen Microbiol. 40, 273-281.

WICKERHAM L.J. 1951. Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin of the U.S. Dept. Agr. 1029, 1-56.

WILKIE D. & B.K. LEE. 1965. Genetic analysis of actidione resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Genet. Res.6, 130-138.

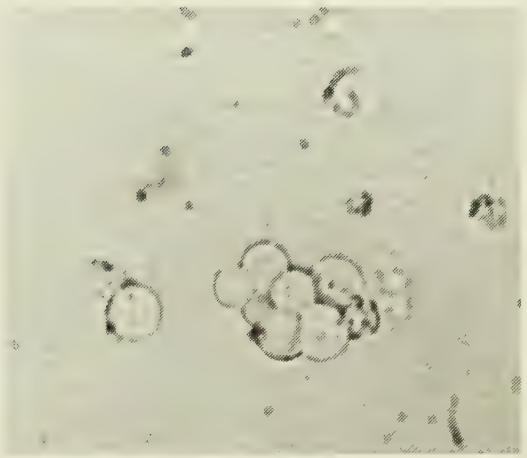
WINDISCH S. 1940. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an *Torulopsis pulcherrima Saccardo* und *Candida Tropicalis* BERCKHOUT. Ein Beitrag zur Systematik der Gärungsmonilien. Arch. Mikrobiol. 11, 368-390.

YAMAMURA M., Y. TERANISHI, A. TANAKA, S. FUKUI. 1975. Preparation of protoplasts of hydrocarbon utilizing yeast cells and their respiratory activities. Agr. Biol. Chem. 39 (1), 13-20.



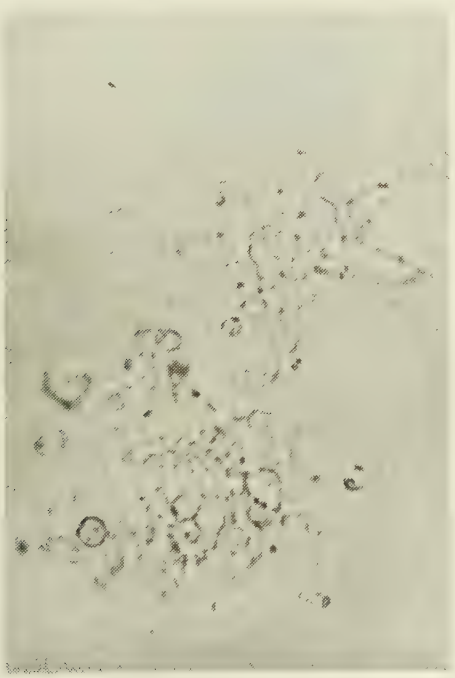
- 1 -

Protoplastes dans un milieu hypertonique
(KCl 1,2 M + $CaCl_2$ 0,2%)



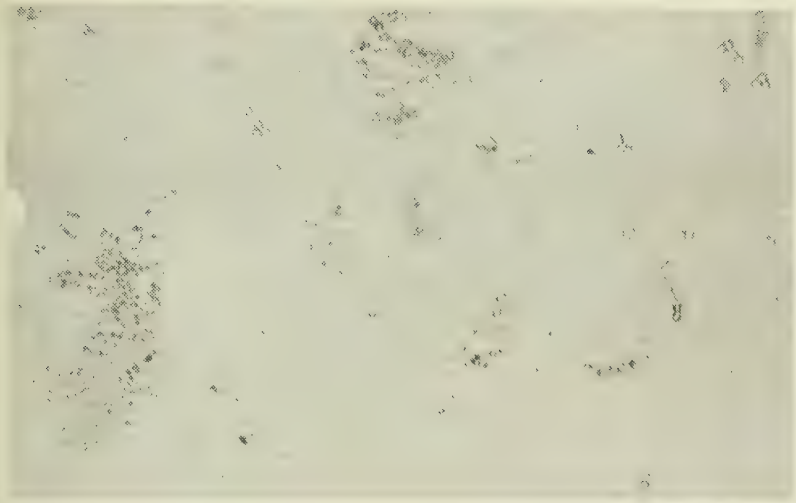
- 2 -

Protoplastes accolés sous
l'action fusogène du polyéthylène
glycol (PM : 6000)



- 3 -

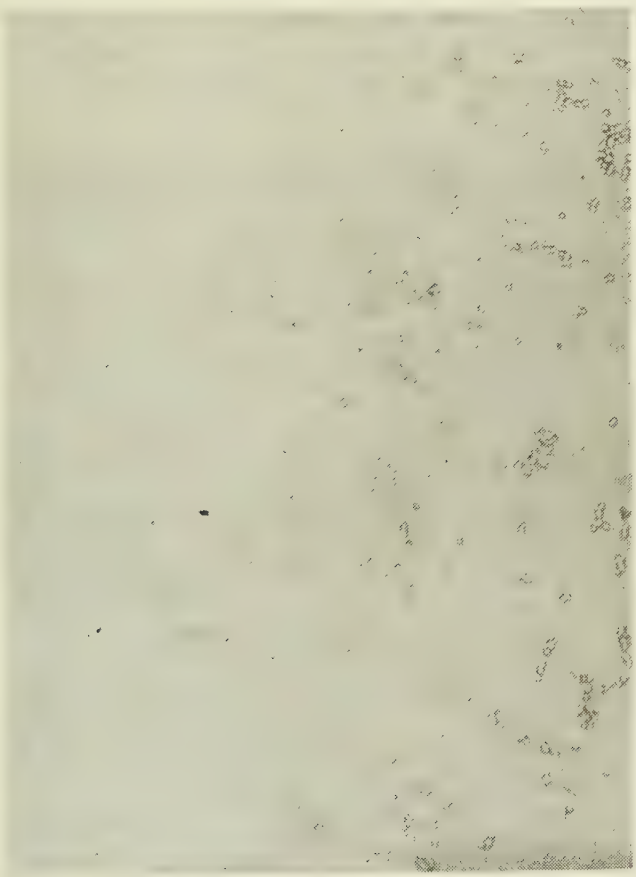
Cellules régénérées (après l'action du PEG) dans un milieu minimum contenant du mannitol 8%. Les cellules sont restées accolées Certaines cellules sont de plus grande taille et proviennent sans doute de la fusion de plusieurs protoplastes.



- 4 -

- 5 -

Cellules de souche sauvage recueillies sur MM + p-FPA. On observe la réduction de la taille des cellules (photo n° 5) et leur évolution vers la taille normale dans le cas d'une colonie plus âgée (photo n° 4)
Grossissement x 250



- 6 -

- 7 -

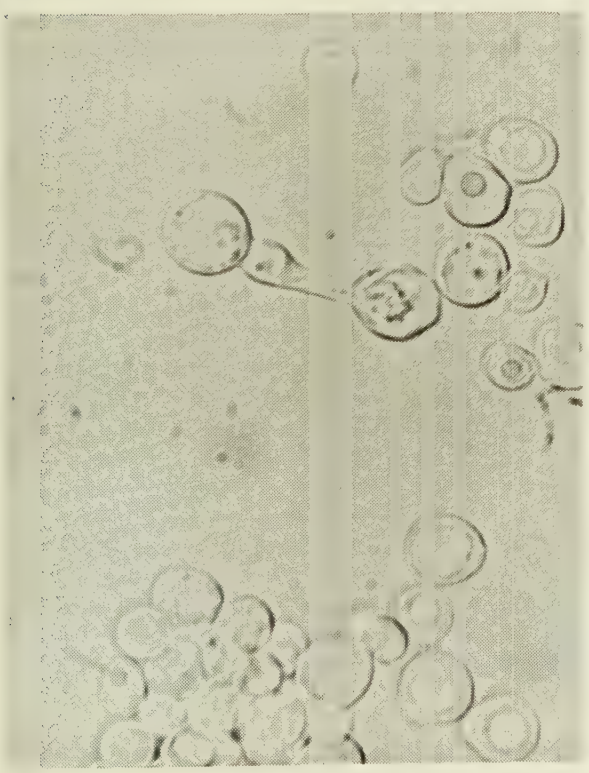
Cellules de souche sauvage en culture liquide sur YEA (photo n° 6) et YEA + p-FPA (photo n° 7) au bout de 2 jours. On constate la différence du nombre de petites cellules.
Grossissement x 250

- 8 -

Coloration nucléaire de cellules de la souche B en phase exponentielle.
Variant morphologique dit : colonie lisse

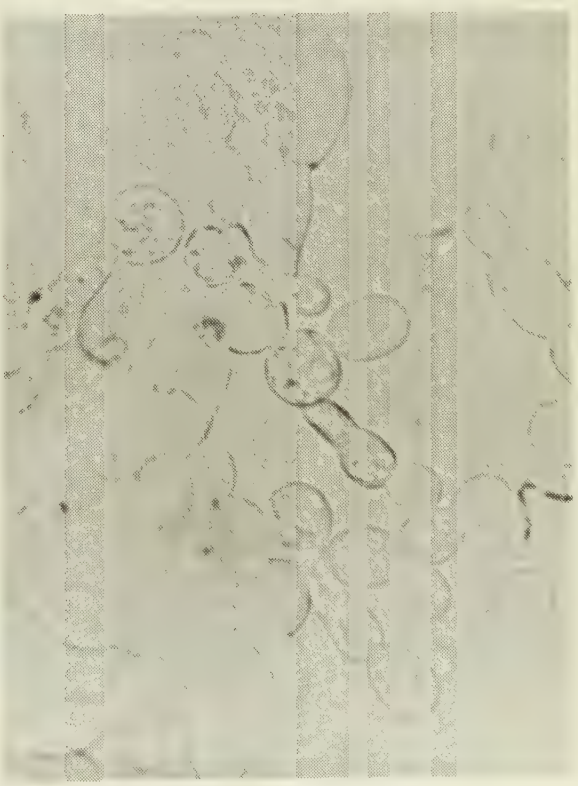
- 9 -

Coloration nucléaire de cellules de la souche B en phase exponentielle.
Variant morphologique dit "colonie frisée"



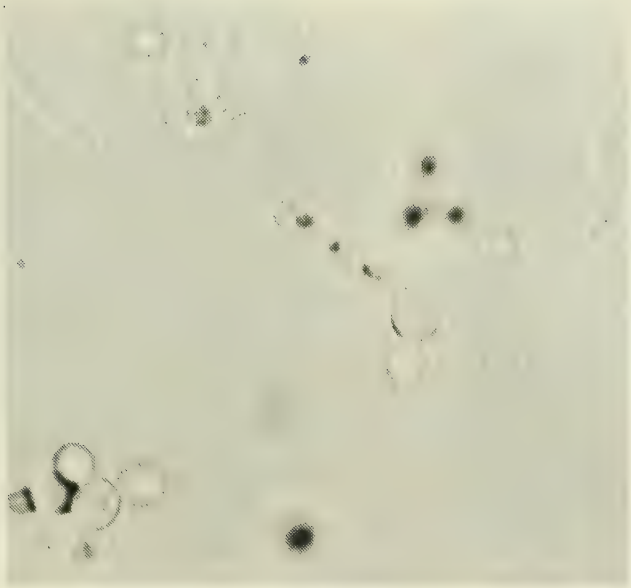
- 10 -

Chlamydospores observées sur milieu YEA liquide épuisé.



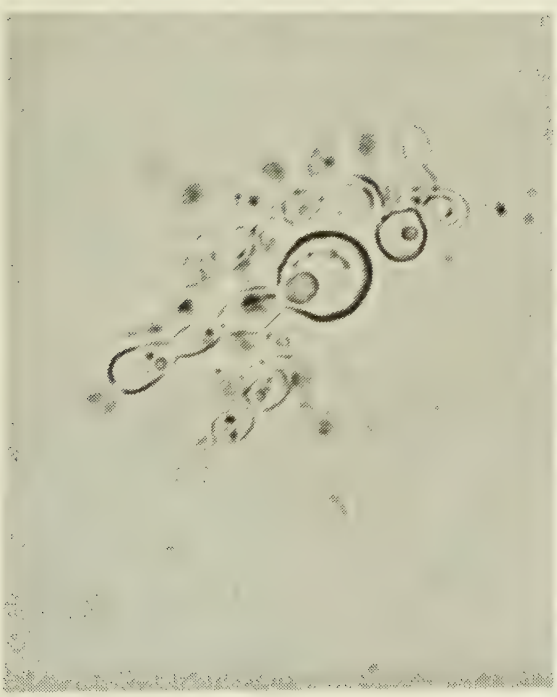
- 11 -

Germination de chlamydospores sur milieu au malt.

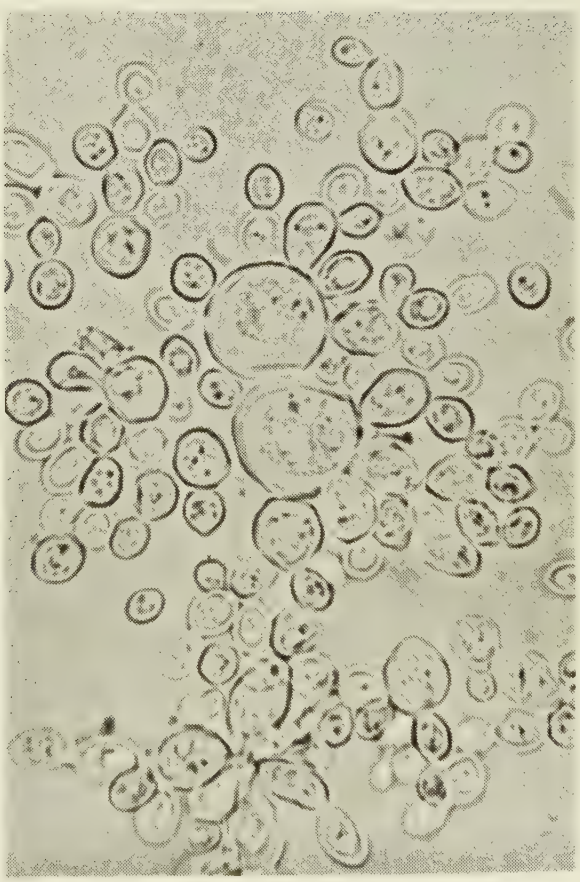


- 12 -

Chlamydospore terminale formée sur milieu au riz.

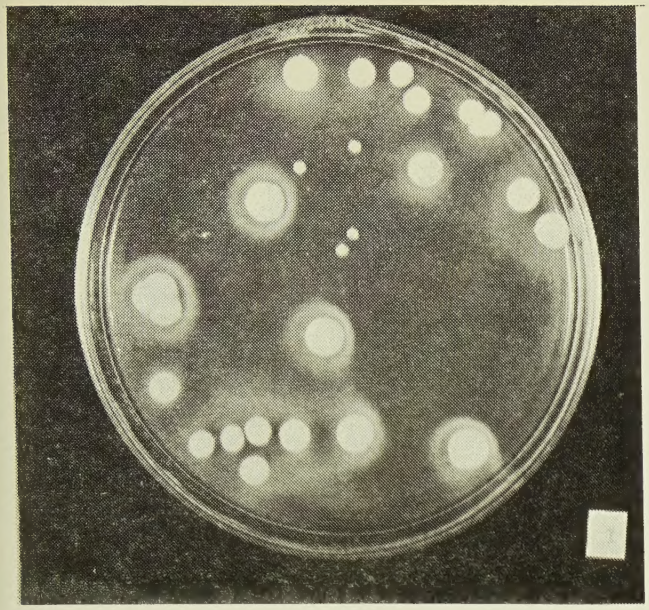


- 13



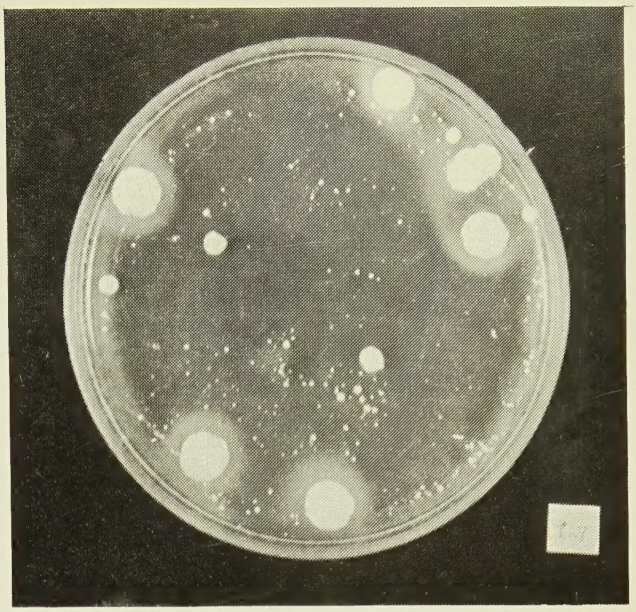
- 14 -

Chlamydospores libres observées sur MM dans des produits de fusion dès leur apparition. Certaines germent, tandis que d'autres sont entourées de bouquets de cellules accolées.



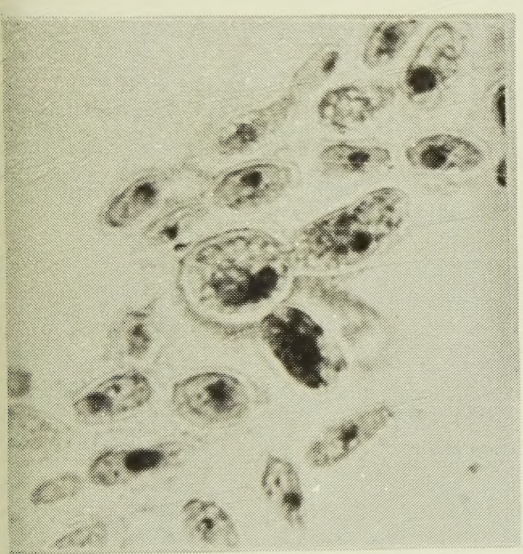
- 15 -

Témoin de réversion de la souche A leu⁻ sur milieu minimum.



- 16 -

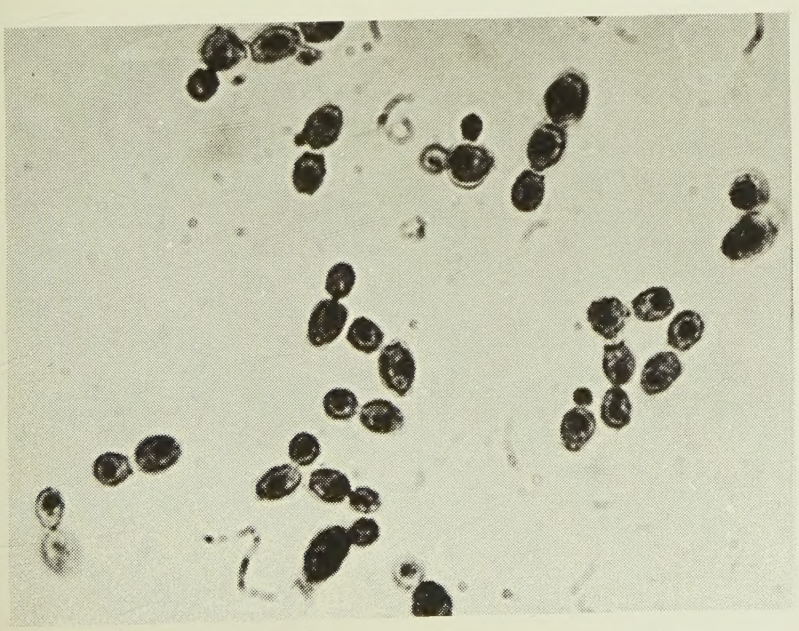
Croisement A leu⁻ x C cyt⁻ (1). Parmi les petites colonies il y a des réversions leaky du marqueur leu⁻ et également des produits de fusion.



- 17 -

- 18 -

Figures de germination anormale (rappelant des basides) observées dans le prototrophe I sur MM.



- 19 -

Coloration nucléaire d'un prototrophe stabilisé. Ce prototrophe a été obtenu par fusion de protoplastes. Les cellules sont monocaryotiques.